



UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

THESE DE DOCTORAT

(Spécialité : Océanologie Biologique)

Présentée par :

Leila Hamida

Pour obtenir le titre de Docteur
de l'Université de Bretagne Occidentale

**Reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus*, en milieu naturel
(sud Tunisie) et en milieu contrôlé (écloserie expérimentale) :
relation avec le système immunitaire**

Soutenue le 14 octobre 2004 devant la commission d'examen

Mr. Marcel Le Pennec, Directeur de thèse
Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.

Mr. Hervé Le Bris, Rapporteur
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes, France.

Mr. Mohamed Salah Romdhane, Rapporteur
Professeur à l'Institut National Agronomique de Tunisie, Tunis, Tunisie

Mme. Christine Paillard, Examinatrice
Chargée de recherche CNRS / LEMAR, UBO.

Mr. Mohamed Najib Medhioub, Examineur
Chercheur à l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer, Monastir, Tunisie

Mr. Jacques Clavier, Examineur
Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Mr. Jean Claude Cochard, Invité
Chercheur, laboratoire IFREMER, Tahiti, Polynésie Française.

Dédicace

Cette thèse, je la dédie particulièrement à ma mère, qui par son amour, son courage, sa bonne volonté, ses conseils, son assistance et sa passion pour les études, m'a aidée et m'a soutenue tant sur le plan moral que financier pour voir se réaliser un de ses vœux les plus chers. Je te remercie maman et je m'engage à demeurer attachée aux principes que tu n'as jamais cessée à m'inculper de savoir : le sérieux, l'honnêteté et la volonté d'atteindre nos objectifs.

A la mémoire de mon père, qui nous a quitté il y a bien longtemps. J'espère que là où il est il sera fier de moi. Je prie Dieu de l'accepter dans son éternelle miséricorde.

Remerciements

J'exprime toute ma reconnaissance envers mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Marcel Le Pennec qui a accepté d'encadrer cette thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, son aide et ses conseils.

Je remercie particulièrement Monsieur Jean Claude Cochard pour avoir mis à ma disposition tous les moyens techniques, scientifiques et matériels indispensables à la réalisation de mon travail, pour ses conseils, son savoir-faire et ses encouragements.

Je remercie spécialement Madame Christine Paillard pour ses qualités scientifiques et humaines, d'avoir accepté de mener au bout ce travail, pour l'intérêt qu'elle a accordé à cette étude et pour m'avoir fait bénéficier de son savoir.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Amor EL Abed d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail sur le territoire tunisiens et pour sa confiance en ce travail.

Je remercie également Monsieur Mohamed Nejib Medhioub pour l'intérêt scientifique qu'il a porté à ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur Mohamed Saleh Romdhane d'avoir accepté de juger cette thèse, pour sa confiance et son encouragement.

Ce travail doit aussi son aboutissement à la collaboration de nombreux chercheurs et techniciens. Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux équipes de recherches de :

- *Écloserie expérimentale d'Argenton (Brest), mes pensées vont particulièrement à Christian Mingant qui a été pour moi l'ami, le grand frère et le confident tous au long de mon séjour à Brest, qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour l'aide qu'il m'a prodigué. Et Stephane Pouvreau pour ses suggestions et ses conseils.*

- *Écloserie expérimentale de Monastir, en particulier Soundes et Jamel dont l'aide a été pour moi déterminante dans la réalisation de ce travail.*

- *Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), IUEM, Brest. Spécialement Phillipe soudant, Christophe Lambert et Alain Lemerrier pour leur aide et leur disponibilité.*

- *Laboratoire de Physiologie des Invertébrés à Ifremer, Brest (LPI). Je remercie sincèrement Philippe Miner qui a contribué à la réalisation de ce travail.*

Réaliser cette thèse m'a beaucoup appris dans le domaine de la recherche biologique et de l'aquaculture mais aussi de l'amitié. Mes pensées vont tout d'abord à Joelle qui a été et serait toujours pour moi l'amie qui m'a entourée de ses conseils, ses encouragements et de sa bonne volonté à aider les autres et être là dans les moments difficiles, qu'elle soit assurée de ma reconnaissance. A Istirah (ma petite sœur) qui a su s'occuper de moi lorsque j'avais besoin d'aide. A tous mes amis qui m'ont soutenu jour après jour et m'ont apporté leur joie de vivre et leurs connaissances scientifiques.

Je ne pourrais clore ses remerciements sans adresser le plus grand merci à ma famille qui a cru en moi, elle a su m'encourager à achever mes travaux de thèse malgré maintes difficultés.

Pour leur soutien et leur motivation tout au long de ce travail. Merci Moumou, Nadou, Doudou, Goo, et Kamel.

AVANT PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de coopération : Aquaculture 2001 entre l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Tunisie et l'Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer (IFREMER), France. Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Direction des Ressources vivantes à Ifremer Brest, au Laboratoire des Sciences de l'environnement Marin (LEMAR) à l'Institut Universitaire Européen la Mer (IUEM/U.B.O.) et au laboratoire d'aquaculture, à INSTM, centre de Monastir (Tunisie).

Liste des abréviations

ACP	A ctivité de la P hosphatase acide
CE	C onditionnement E té
CH	C onditionnement H iver
CHD	C oncentration H émocytaire D ifférentielle
CHT	C oncentration H émocytaire T otale
D	D égénérescence
DG	D ébut de G amétogenèse
DO	D iamètre O vocytaire
DOM	D iamètre O vocytaire M oyen
GRA	G ranulocytes
GV	G erminal V esical (vésicule germinative)
GVBD	G erminal V esical B reak D own (repture de la vésicule germinative)
HT	H émocytes T otaux
HYA	H yalinocytes
IC	I ndice de C ondition
K-W	K ruskal- W allis
M	M aturation
MN	M ilieu N aturel
M-W	M ann- W hitney
S	S ection ovocytaire
V	V itellogenèse

Sommaire

INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 : ÉTUDE COMPARATIVE DU CYCLE DE REPRODUCTION DE LA PALOURDE RUDITAPES DECUSSATUS EN MILIEU NATUREL (SUD TUNISIE) ET EN MILIEU CONTRÔLÉ (ÉCLOSERIE).	12
1.1. Introduction	12
1.2. Matériels et méthodes	12
1.2.1. Matériels biologiques et conditions d'élevages	12
1.2.2. Paramètres étudiés	15
1.2.3. Analyses statistiques	20
1.3. Résultats	21
1.3.1. Cycle de reproduction en milieu naturel	21
1.3.1.1. Indice de condition	21
1.3.1.2. Évolution du diamètre ovocytaire moyen	21
1.3.1.3. Distribution de fréquence des diamètres ovocytaires	22
1.3.1.4. Évolution des stades reproductifs	24
1.3.2. Cycle de reproduction en milieu contrôlé	24
1.3.2.1. Indice de condition	24
1.3.2.2. Évolution du diamètre ovocytaire moyen	25
1.3.2.3. Distribution des fréquences des diamètres ovocytaires	27
1.3.2.4. Évolution des stades reproductifs	29
1.4. Discussion et conclusion	31
CHAPITRE 2 : ÉVALUATION DE LA COMPÉTENCE DES OVOCYTES À LA FÉCONDATION PAR LA SÉROTONINE (5-HT)	35
2.1. Introduction	35
2.2. Matériels et méthodes	35
2.2.1. Conditions expérimentales	35
2.2.2. Méthodes utilisées	36
2.2.2.1. Obtention des gamètes	36
2.2.2.2. Tests d'induction à la GVBD	36
2.2.2.3. Tests de fécondation	37
2.3. Résultats	39
2.3.1. Induction à la GVBD	39
2.3.1.1. Effet de la sérotonine	39
2.3.1.2. Effet du temps	39
2.3.2. Tests de fécondation	40
2.4. Discussion et conclusion	42

CHAPITRE 3 : ÉVALUATION DES PARAMÈTRES IMMUNITAIRES DE <i>R. DECUSSATUS IN SITU</i> ET EN CONDITIONNEMENT : RELATION AVEC SON CYCLE SEXUEL.	45
3. 1. Introduction	45
3.2. Matériels et méthodes	48
3.2.1. Matériels biologiques et conditions d'élevages	48
3.2.2. Paramètres étudiés	48
3.2.2.1. Étude du cycle de reproduction	48
3.2.2.2. Diagnostic du système immunitaire	49
a. Prélèvement de l'hémolymphe	49
b. Choix du fixateur	50
c. Concentration hémodocytaire totale (CHT) et différentielle (CHD)	50
d. Dosage des protéines sériques	51
e. Mesure de l'activité de la phosphatase acide dans le sérum	52
3.2.3. Analyses statistiques	52
3.3. Résultats	53
3.3.1. Paramètres immunitaires en milieu naturel	53
3.3.1.1. Paramètres cellulaires	53
3.3.2. Paramètres immunitaires en milieu contrôlé : hiver 2002	56
3.3.2.1. Paramètres cellulaires	56
3.3.2.2. Paramètres biochimiques	58
3.3.2.3. Relation entre paramètres immunitaires et paramètre de suivi du cycle sexuel	58
3.3.3. Paramètres immunitaires en milieu contrôlé : été 2002	59
3.3.3.1. Paramètres cellulaires	59
3.3.3.2. Paramètres biochimiques	61
3.3.3.3. Relation entre paramètres immunitaires et paramètres de suivi du cycle sexuel	61
3.4. Discussion	63
3.5. Conclusion	69
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
ANNEXES	88

Introduction

La palourde *Ruditapes decussatus* (L.), de la famille des Veneridae, est présente en mer du Nord et dans le nord-est atlantique, depuis les côtes norvégiennes jusqu'aux Açores et aux côtes sénégalaises. Elle est commune dans les zones estuariennes et lagunaires de la majeure partie du bassin méditerranéen (Parache, 1982 ; Lubet, 1984). On la rencontre dans des sables, des graviers envasés ou des vases au dessous du niveau de mi-marée (Tebble, 1966). En Tunisie elle est présente sur presque tout le littoral, en particulier dans le golfe de Gabès (Medhioub, 1983). Dans ce pays, *R. decussatus* représente un enjeu économique important, tant au niveau de l'emploi que de la balance commerciale du pays *via* son exportation vers l'Europe.

En conchyliculture, le conditionnement des reproducteurs est l'une des phases clés de la réussite de la production larvaire et la connaissance préalable du déroulement du cycle sexuel dans la nature est indispensable pour maîtriser cette étape. Plusieurs études sur le cycle de reproduction de *R. decussatus* en milieu naturel ont été réalisées dans différents pays dont la Tunisie (Zamouri-Langar, 1991 ; Trigui-El Menif *et al.*, 1995), le Maroc (Shafee & Daouadi, 1991), la France (Gallois, 1977 ; Beninger & Lucas, 1984 ; Laruelle *et al.*, 1994 ; Laruelle, 1999), l'Espagne (Rodriguez-Moscoso & Arnaiz, 1998), l'Irlande (Xie & Burnell, 1994), et l'Italie (Breber, 1980). Par contre, en milieu contrôlé, la dynamique de la gamétogenèse a été décrite, notamment chez *Crassostrea gigas* (Lubet, 1976 ; Lubet et Mathieu, 1999 ; Lango-Reynoso *et al.*, 2000 ; Chàvez-Villalba, 2001 ; Chàvez-Villalba *et al.*, 2002a,b) et *R. philippinarum* (Mann, 1979a ; Toba & Miyama, 1991 ; Zine *et al.*, 1998) ; chez *R. decussatus* aucune étude de ce type n'a été réalisée. Toutefois, Mann, 1979a ; Toba et Miyama, 1991 et Zine *et al.*, 1998 ont étudié le cycle sexuel de *R. philippinarum* en milieu contrôlé mais aucune étude en relation avec le milieu naturel n'a été réalisée, pourtant cette liaison est essentielle à la compréhension de la gamétogenèse pendant le conditionnement. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à étudier dans un premier temps le déroulement de la gamétogenèse chez *R. decussatus*, indigène de la Tunisie, en milieu contrôlé, en relation avec son cycle naturel afin de mieux comprendre sa dynamique et mieux maîtriser son élevage.

Au cours de la précédente décennie, la Tunisie s'est ouverte sur l'aquaculture proposant un schéma de développement et d'aménagement de cette économie de la mer pour l'ensemble du

littoral. Parmi les espèces cibles retenues pour ce pays, le vénéridé *R. decussatus*, constitue l'enjeu économique le plus important en conchyliculture. Deux approches sont suivies pour développer la vénériculture : la préservation de cette ressource grâce à la mise en place de mesures de gestion des pêches et, en parallèle, le repeuplement du milieu à partir de naissains produits en éclosérie. Ceci sous-entend un développement optimal des techniques de production en éclosérie et une maîtrise de l'élevage sur le terrain, comme cela s'est fait en France pour l'espèce indo-pacifique *Ruditapes philippinarum* et depuis quelques années au Chili, pour un autre vénéridé *Venus antiqua* (Bustos & Olavarria, 2000).

En éclosérie, l'obtention des gamètes de bivalves devant conduire à des élevages larvaires se fait, en routine, notamment par application de la méthode des chocs thermiques (Loosanoff & Davis, 1963). Celle-ci a fait ses preuves chez plusieurs bivalves d'intérêt aquacole (Le Pennec, 1987). Nous proposons, dans une partie de notre étude (chapitre 2), une méthode alternative aux chocs thermiques qui nous permette d'obtenir plus facilement et plus rapidement des gamètes, par dissection de la gonade. Cette méthode fait intervenir l'inducteur chimique : la sérotonine (5-HT) qui permet aux ovocytes d'atteindre le stade de maturité et être prêts à la fécondation. De même, nous proposons d'étudier d'autres approches permettant de caractériser l'état de maturité ovocytaire chez *R. decussatus* en conditionnement et d'évaluer l'aptitude des ovocytes à être fécondés en se basant sur la sérotonine.

Par ailleurs, nous savons que la reproduction des mollusques bivalves est fortement influencée par les facteurs abiotiques et biotiques de l'environnement (température, salinité, polluants, agents pathogènes, ressources trophiques ...) (Loosanoff & Davis, 1963 ; Sastry, 1968 ; Mann, 1979 a,b) qui modulent fortement leur système immunitaire (Feng, 1965 ; Fisher et Newell, 1986 ; Fisher, 1988 ; Fisher *et al.*, 1989 et 1996 ; Oubella *et al.*, 1996). Ainsi, pour approfondir nos connaissances, nous avons recherché si des variations des paramètres cellulaires et biochimiques de l'hémolymphe pouvaient être associées à des changements physiologiques liés à la reproduction. Pour cela, un suivi des paramètres immunitaires : cellulaires et humoraux, au sein de l'hémolymphe a été réalisé en parallèle à celui de la reproduction en milieu naturel et en milieu contrôlé sur les mêmes individus. Cette étude tentera aussi d'établir de nouveaux critères de maturation ovocytaires en se basant sur les paramètres immunitaires.

Cette thèse présentera donc trois parties, dans le premier chapitre, on étudiera le cycle sexuel de R. decussatus en milieu contrôlé en relation avec le milieu naturel afin de mieux comprendre sa dynamique de gamétogenèse et de mieux apprécier le rôle positif que joue le conditionnement dans la réussite de la reproduction artificielle, chose qui n'a jamais été faite pour R. decussatus en Tunisie. Dans le second chapitre, on s'intéressera à mettre en place, pour la première fois, une nouvelle approche d'évaluation de la compétence des ovocytes à la fécondation et d'établir de nouveaux critères d'évaluation de leur maturité en se basant sur l'inducteur chimique la sérotonine. En 3^{ème} et dernière partie de cette thèse, on tentera d'établir une approche originale entre les estimateurs du cycle sexuel et les paramètres immunitaires afin d'approfondir notre étude et rechercher si des variations des paramètres cellulaires et biochimiques de l'hémolymph pouvaient être associées à des changements physiologiques liés à la reproduction.

CHAPITRE 1 : Étude comparative du cycle de reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu naturel (sud Tunisie) et en milieu contrôlé (écloserie).

1.1. Introduction

Une étude comparative du cycle de gamétogenèse de *R. decussatus* a été réalisée en milieu naturel sur une année et en milieu contrôlé sur deux périodes de l'année, lors de deux conditionnements hivernaux et d'un conditionnement estival. La description du cycle de gamétogenèse a été réalisée à l'aide des méthodes qualitatives par analyse histologique et semi-quantitatives par suivi de l'indice de condition et l'analyse d'images. Ces méthodes consistent en l'utilisation d'indices traduisant les variations de la condition, l'effort de reproduction et les émissions gamétiques et l'application d'une échelle de maturité. Il s'agit d'approches complémentaires et indispensables dont les résultats, plus ou moins détaillés suivant la méthode, sont convergents.

L'objectif de ce chapitre est donc, de définir les critères d'évaluation de la maturité des reproducteurs de *R. decussatus* et de mettre en évidence le rôle positif joué par le conditionnement dans la réussite de la reproduction expérimentales, en comparant le déroulement de la gamétogenèse chez ces reproducteurs en milieu contrôlé et en milieu naturel.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Matériels biologiques et conditions d'élevages

La population naturelle choisie est située à Oued Maltine (région de Sfax, sud tunisien) (Fig. 1). Le cycle de reproduction a été étudié pendant l'année 2001 et au début de 2002. Les prélèvements de 100 à 150 individus de 30 à 46 mm (de longueur de coquille) ont été mensuels de janvier à mai et bimensuels de juin à décembre, suivis de deux prélèvements mensuels en janvier et février 2002.

Le conditionnement des géniteurs originaire de l'Oued Maltine (150 individus de 30 à 46 mm) a été effectué du :

- 15 janvier au 15 mai pour 2001 (conditionnement hiver - printemps)
- 06 février au 07 mai pour 2002 (conditionnement hiver - printemps)

- 10 juillet au 25 octobre pour 2001 (conditionnement été - automne).

Le conditionnement a été effectué dans l'écloserie expérimentale de Monastir (Fig. 2 A/B/C/D), dépendant de l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer (INSTM), suivant le protocole défini par Medhioub *et al.* (2000). En particulier la température était maintenue à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, la salinité à $30 \pm 1 \text{ ‰}$ et l'éclairement était continu. L'alimentation était constituée d'un mélange d'algues unicellulaires *Chaetoceros calcitrans* et *Isochrysis galbana*. La ration alimentaire était de $1 \cdot 10^9$ cellules par individu et par jour. Le milieu était renouvelé toutes les 24 heures. Au cours de ces périodes, 10 individus ont été prélevés 2 fois par mois

N.B. Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, le conditionnement hiver – printemps est appelé conditionnement d'hiver et celui de l'été et l'automne est appelé conditionnement d'été.

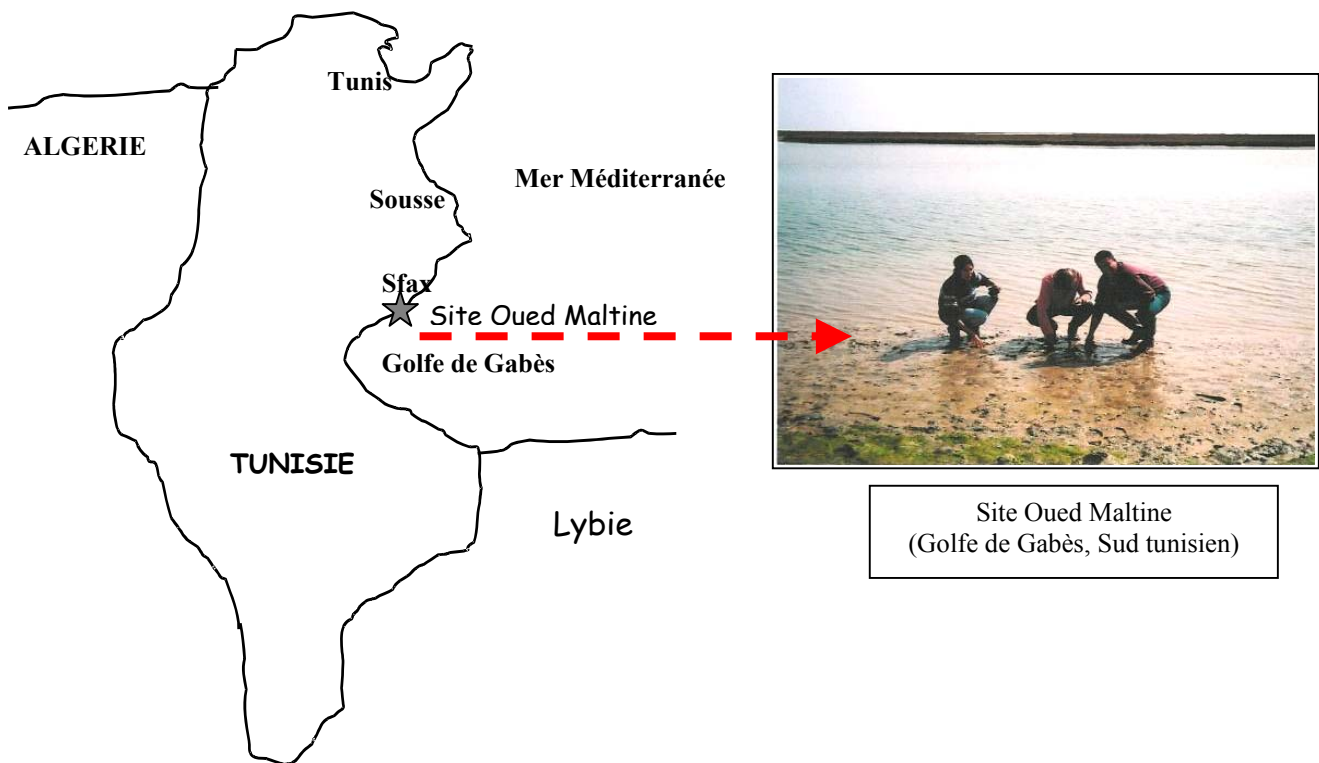


Figure 1 : Emplacement du site d'échantillonnage (Oued Maltine, Golfe de Gabès, sud tunisien)

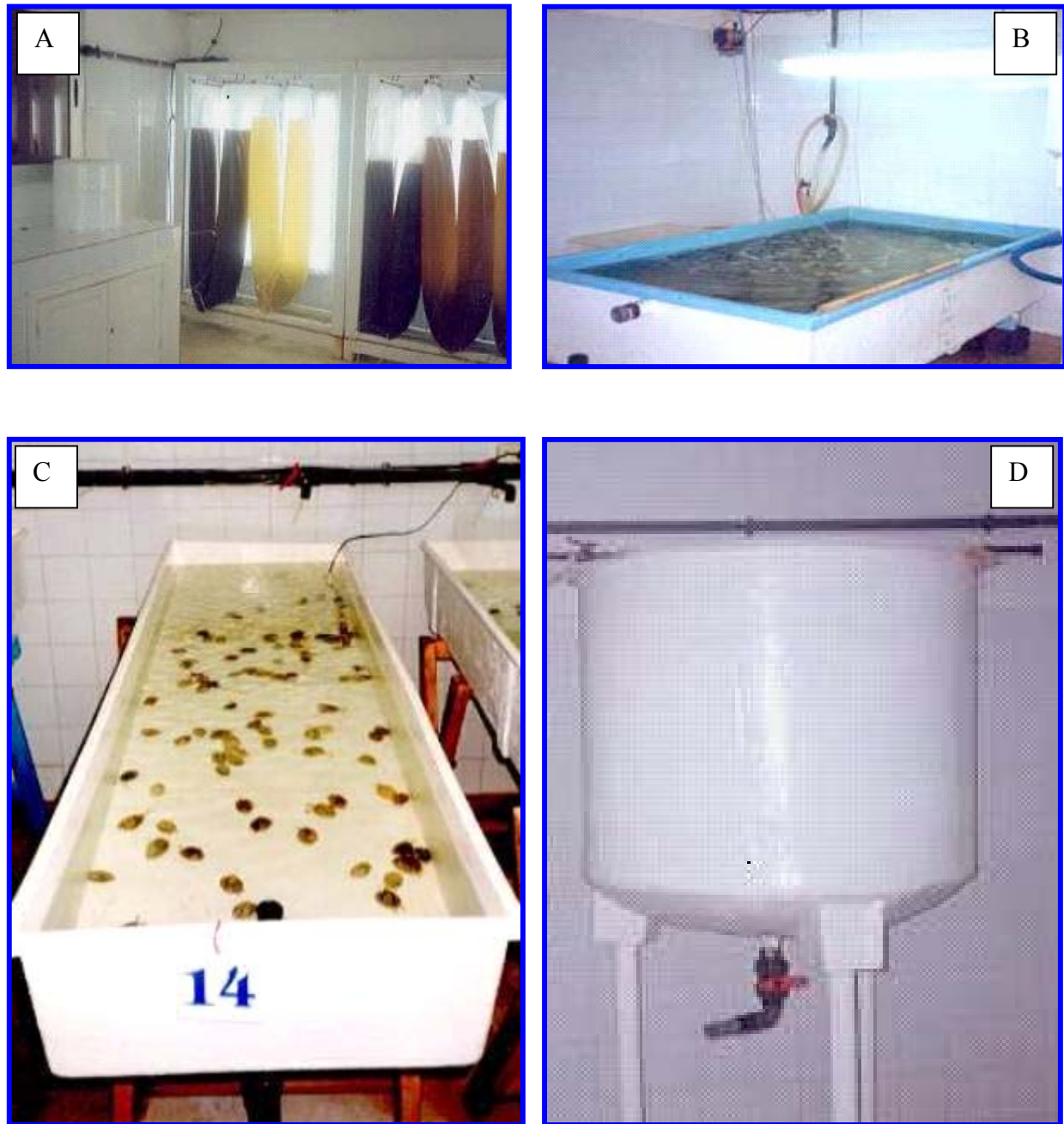


Figure 2 : Écloserie expérimentale de Monastir. A : Sacs de production des micro-algues (salle de culture d'algues). B : Bac de mélange d'algue pour la distribution de la nourriture pour les géniteurs. C : Bac de conditionnement des géniteurs de palourdes (salle géniteurs). D : Bac cylindro-conique pour les élevages larvaires (salle d'élevage larvaire).

1.2.2. Paramètres étudiés

1.2.2.1. Indice de condition

L'indice de condition (IC) choisi pour décrire le cycle de reproduction est celui proposé par Beninger (1984). Son suivi permet de connaître les étapes de la gamétogenèse et les périodes des émissions gamétiques. L'IC correspond au rapport du poids sec des tissus sur le poids sec de la coquille multiplié par 100. Il a été calculé pour 10 palourdes prises au hasard. Le poids des tissus secs est obtenu après passage à l'étuve à 60°C pendant 24h (IC \pm 0,1 g près).

1.2.2.2. Histologie classique

Dix palourdes ont été choisies d'une façon aléatoire. Après identification du sexe par frottis, la masse viscérale des mâles et des femelles, a été fixée dans du liquide de Bouin. Les pièces ont été ensuite déshydratées dans une série de bains d'alcool de concentration croissante puis dans le toluène (Tab. 1). Les tissus ont été ensuite imprégnés et inclus dans la paraffine.

<i>Réactif</i>	<i>Durée d'immersion</i>
Éthanol 80°	1 heure
Éthanol 95°	2 heures
Éthanol 95°	2 heures
Éthanol 100°	2 heures
Éthanol 100°	2 heures
Éthanol 100°	1 heure
Xylène	1 heure
Xylène	2 heures
Paraffine liquide (à 60°C)	2 heures
Paraffine liquide (à 60°C)	2 heures
Inclusion en bloc	

Tableau 1 : Protocole pour l'histologie : déshydratation et inclusions des tissus gonadiques

Des coupes de 7 μ m d'épaisseur ont été réalisées au microtome, puis montées sur lames avant coloration par l'hématoxyline-éosine (Gabe, 1968). Les coupes ont d'abord été déparaffinées pour réhydrater les tissus. Ainsi, elles subissent différents bains de xylène, puis d'éthanol de degré décroissant (100°, 95° puis 70°) et enfin d'eau distillée. Elles sont ensuite colorées par

l'hématoxyline de Harris et l'éosine, avant d'être à nouveau déshydratées par des bains d'éthanol de degré croissant et de xylène (Tab. 2). Cette coloration, reconnue comme un standard chez les bivalves, contraste clairement les différents tissus.

Le protocole utilisé est une adaptation selon l'appareil de la procédure énoncée par le N.O.A.A. (*National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. department of Commerce*)

<i>Réactif</i>	<i>Durée d'immersion</i>
Xylène	10 minutes
Xylène	5 minutes
Xylène	5 minutes
Éthanol 100°	5 minutes
Éthanol 100°	5 minutes
Éthanol 100°	5 minutes
Éthanol 95°	3 minutes
Éthanol 95°	3 minutes
Éthanol 70°	3 minutes
Éthanol 70°	3 minutes
Eau distillée	2 minutes
Hématoxyline	8 minutes
Eau distillée	2 minutes
Alcool acide	5 secondes
Eau courante	5 minutes
Eau distillée	3 minutes
Éthanol 95°	3 minutes
Éosine	3 minutes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	5 secondes
Éthanol 95°	3 minutes
Éthanol 100°	1 minute 30 secondes
Éthanol 100°	3 minutes

Xylène	5 minutes
Xylène	5 minutes
Xylène	5 minutes

Tableau 2 : Protocole pour l’histologie : déshydratation et coloration des tissus gonadiques.

1.2.2.3. Analyses d’images

Pour les femelles, la taille des ovocytes a été mesurée par analyse d’images. Les lames ont été placées sous un microscope équipé d’une caméra CCD. Les images ainsi obtenues ont été traitées à l’aide du logiciel IMAQ VISION (National Instrument). De 100 à 150 ovocytes présentant un nucléole visible ont été sélectionnés par femelle. La mesure effectuée par l’analyseur était celle de la surface de la section ovocytaire (S) à partir de laquelle a été déduit le diamètre ovocytaire équivalent (DO), par extrapolation à un disque de surface équivalente, suivant la formule : $DO = \sqrt{(4 \times S / \pi)}$. Ainsi le diamètre ovocytaire moyen (DOM) correspond à la moyenne des diamètres ovocytaires mesurés sur l’ensemble des femelles échantillonnées.

1.2.2.4. Échelle de maturité

L’évaluation de l’état de maturité sexuelle des mâles et des femelles est inspirée de la classification de Lango-Reynoso *et al.* (2000) qui décrit chez l’huître *Crassostrea gigas*, quatre stades de développement en fonction des caractéristiques histologiques de la gonade et du diamètre ovocytaire moyen (DOM) : début de la gamétogenèse (DG), vitellogenèse (V) ou croissance (C), maturation (M) et dégénérescence (D) (Tab. 3A/B, Fig. 3 A/B).

La taille des ovocytes en dégénérescence n’a pas été mesurée à cause de la non conformité de leur aspect (déchirés ou éclatés). Cette phase a été détectée seulement pendant la période des émissions gamétiques en milieu naturel ou suite à des émissions en milieu contrôlé, mais jamais au cours du conditionnement.

Pour les mâles, seule une analyse qualitative, basée sur l’observation et l’interprétation des coupes histologiques est réalisée (Fig. 3B). Les résultats qui concernent la description de leur cycle de reproduction et l’évaluation de leur état de maturité n’ont pas été exploités dans ce présent travail.

A	Stade	Diamètres ovocytaires (μm)	Description histologique (Fig. 3A)
	DG : Début de la gamétogenèse	< 15 μm	Les acini sont peu développés en nombre et en volume dans le tissu conjonctif.
	V : Vitellogenèse	15 - 40 μm	Les cellules restent adhérentes à la paroi des acini et quelques ovocytes sont libres dans la lumière des acini.
	M : Maturation	40 – 60 μm	Les acini de taille homogène sont complètement remplis par les ovocytes matures avec une taille homogène, un noyau visible et parfois un nucléole.
	D : Dégénérescence		Les acini perdent leur adhérence les uns aux autres. Les ovocytes sont parfois allongés ou déchirés, le développement des petits ovocytes est visible sur la paroi des acini.
B	Stade	Description histologique (figure 3B)	
	DG Début de la gamétogenèse	La lignée germinale est réduite à quelques travées cellulaires correspondant à des spermatogonies primitives baignant dans un tissu conjonctif.	
	C Croissance	La spermatogenèse est décelable, apparition de quelques tubules spermatiques. Les acini gagnent en volume et les séquences de la spermatogenèse commencent à être décelées, orientées vers la lumière des acini.	
	M Maturation	La spermatogenèse domine, les spermatozoïdes sont abondants aux centres des follicules, se regroupent en colonne, leurs sections ressemblent à des rosettes.	
	D Dégénérescence	Les follicules perdent leurs aspects adhérents, la lignée germinale est interrompue, quelques spermatozoïdes sont observés dans la lumière des acini	

Tableau 3 : Classification des stades de maturation chez *R. decussatus* selon les caractéristiques histologiques de la gonade et la mesure du diamètre ovocytaire et. A : chez les femelles. B : chez les mâles.

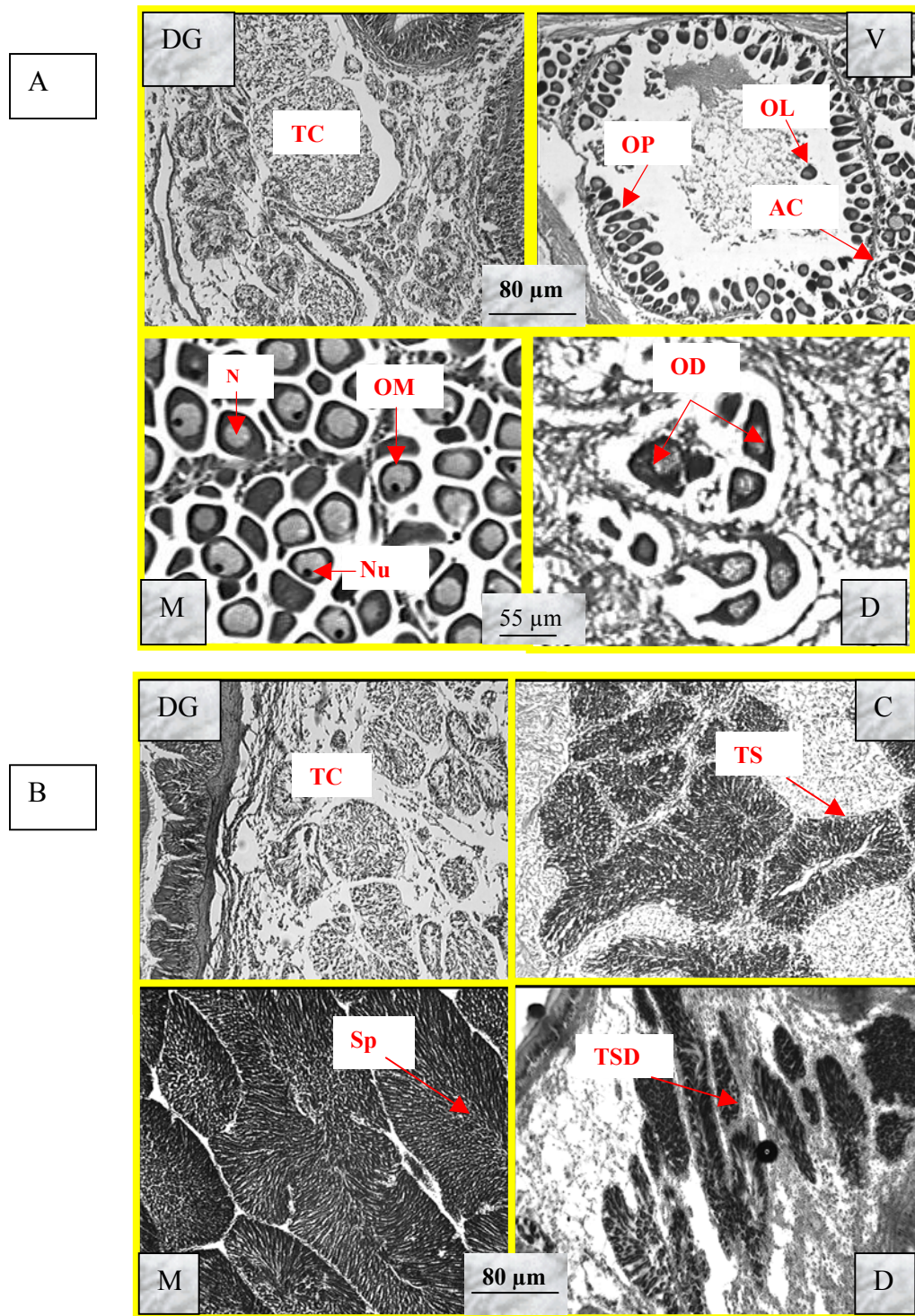


Figure 3 : Stades de maturation gonadique de *R. decussatus*. A :chez les femelles. B : chez les mâles. DG- début de gamétogenèse, V- vitellogenèse, M- maturation, C : Croissance, D- dégénérescence. AC- acini. N- noyau. Nu- nucléole. OD- ovocyte dégénéré. OL- ovocyte libre. OM- ovocyte mature. OP- ovocyte pédonculé. TC- tissu conjonctif. TS- tubules spermatiques. TSD- tubules spermatiques en dégénérescence. Sp.- spermatozoïdes.

1.2.3. Analyses statistiques

Des tests non paramétriques de comparaison multiple ont été utilisés afin de déterminer si la différence entre les moyennes était significative: le test de Kruskal-Wallis qui permet de comparer l'ensemble des moyennes (cas K échantillons indépendants) et celui de Mann-Whitney qui permet de comparer des moyennes prises 2 à 2 (cas de 2 échantillons indépendants).

Des histogrammes fréquence-taille des ovocytes ont été analysés à l'aide du logiciel XSTAT pour suivre l'évolution temporelle des cohortes ovocytaires pour chacune des femelles échantillonnées tout au long de la période de reproduction. Les résultats des histogrammes ont été transformés en courbes pour une meilleure compréhension.

1.3. Résultats

1.3.1. Cycle de reproduction en milieu naturel

1.3.1.1. Indice de condition

Selon les fluctuations de l'indice de condition de *R. decussatus*, *in situ*, durant l'année 2001 (Fig. 4) on peut considérer que le cycle sexuel commence par une période d'augmentation significative de l'indice ($p < 0,05$) de mars à mai, suivi d'une chute en juin et le maximum étant enregistré, au cours de cette période, en début août ($12,3 \pm 1,3$). A partir de juin, des diminutions significatives de l'indice sont observées, notamment en juin, d'août à septembre, en octobre et en décembre.

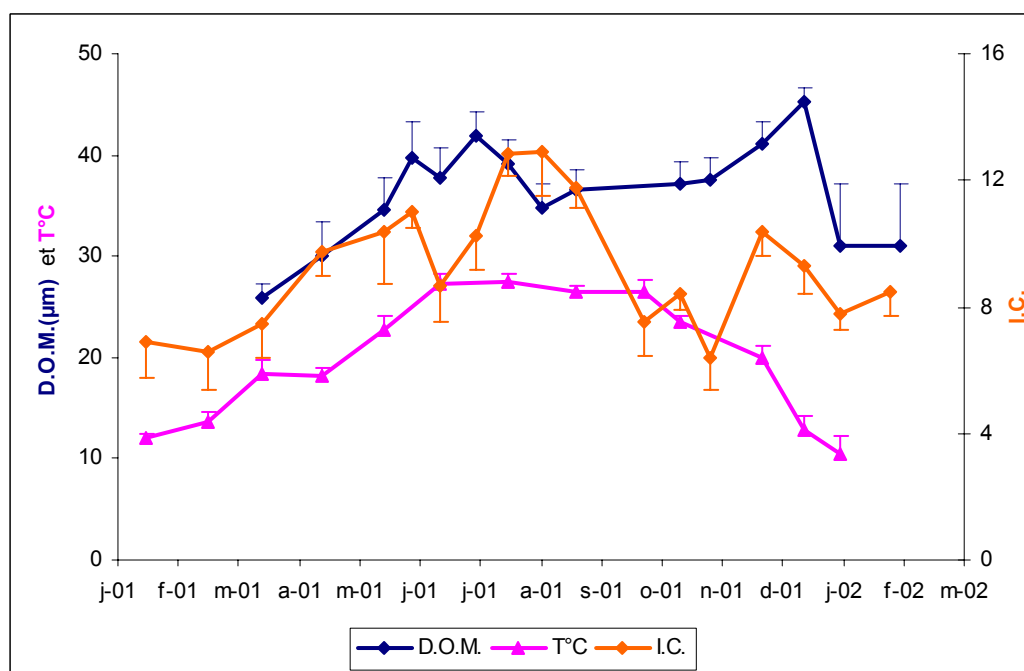


Figure 4 : Évolution de l'indice de condition (IC), du diamètre ovocyttaire moyen (DOM) chez *R. decussatus*, et de la température *in situ*. (Moyenne \pm intervalle de confiance à 95%, (+) pour le DOM et la T°C et (-) pour l'IC).

1.3.1.2. Évolution du diamètre ovocyttaire moyen

La mesure du diamètre ovocyttaire moyen (DOM) confirme les résultats obtenus par l'étude de l'évolution de l'indice de condition (Fig. 4). Deux augmentations significatives du diamètre ovocyttaire ($p < 0,001$) se produisent de mars à juin ($25\text{--}41\text{ }\mu\text{m}$) et de novembre à décembre. Des diminutions significatives de diamètre ovocyttaire sont constatées de juin à juillet, de

juillet à septembre et en décembre. Les baisses les plus marquées sont en décembre et en janvier, où le diamètre ovocytaire chute de $45 \pm 1,4 \mu\text{m}$ à $31 \pm 6 \mu\text{m}$. Ceci est à comparer à la chute de juillet et août où le diamètre passe de $41,8 \pm 2,4 \mu\text{m}$ à $34,8 \pm 6,6 \mu\text{m}$.

1.3.1.3. Distribution de fréquence des diamètres ovocytaires

Sur la figure 5 sont traduites les dates les plus représentatives de la distribution de fréquences des diamètres ovocytaires de *R. decussatus*, *in situ*, pendant l'année 2001. Chaque courbe correspond à la distribution de la fréquence des diamètres ovocytaires d'une femelle. En janvier, la distribution de taille des ovocytes des palourdes présente deux modes correspondant l'un à un diamètre moyen inférieur à $10 \mu\text{m}$ et l'autre à un diamètre moyen supérieur à $40 \mu\text{m}$. Les ovocytes de petite taille grossissent durant cette période pour atteindre une taille voisine de $30 \mu\text{m}$ en avril. Ils continuent leur croissance jusqu'en juillet où la plupart des femelles sont au même stade de maturation avec des diamètres ovocytaires moyens se situent entre 40 et $50 \mu\text{m}$. En août, un étalement des modes vers des diamètres plus faibles est constaté. En octobre, comme en août, la population des femelles est composée d'individus dont certains contiennent des ovocytes en vitellogenèse et d'autres des ovocytes matures. A partir de novembre, un retour des modes vers des diamètres plus importants est alors constaté. En décembre, comme cela était le cas en juillet, toutes les femelles semblent être au même stade.

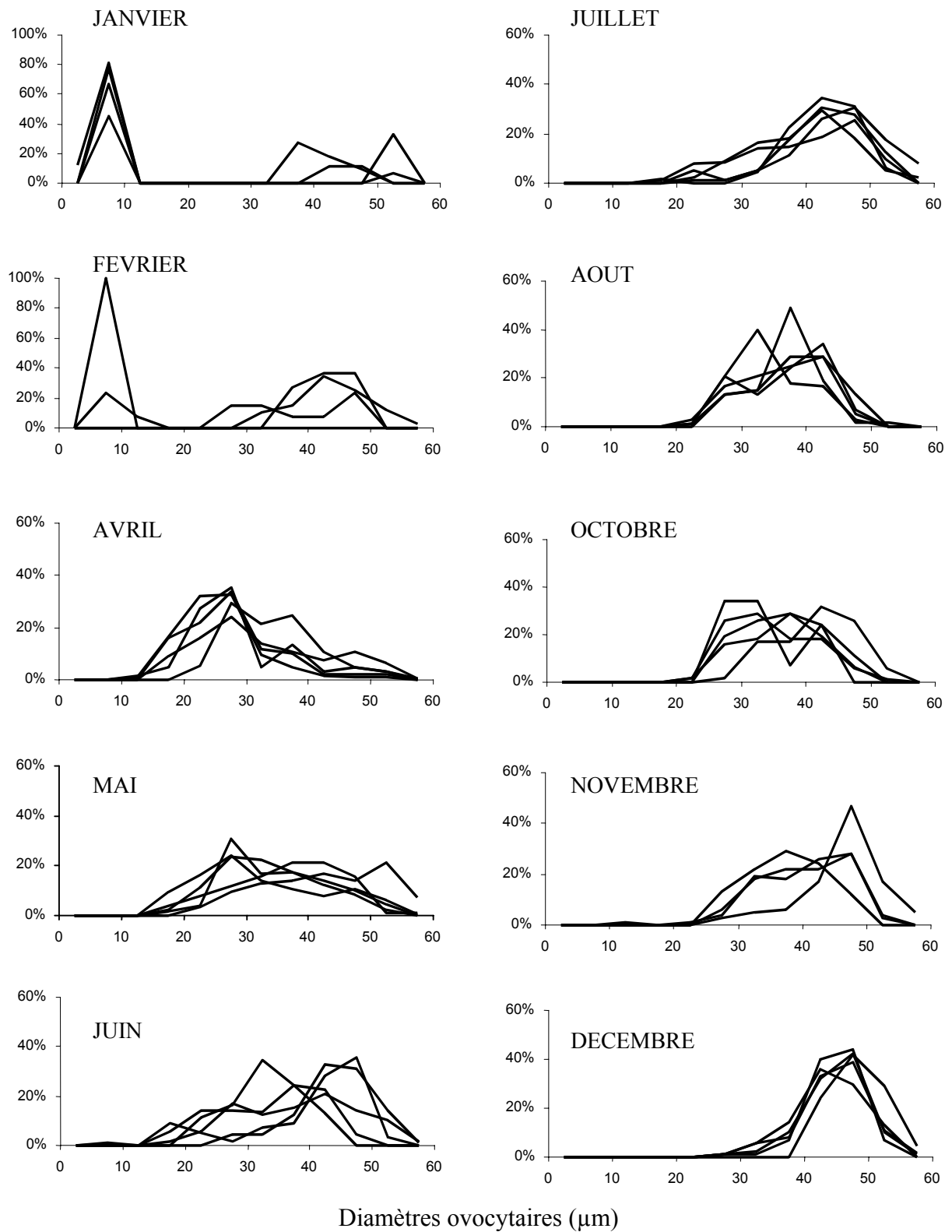


Figure 5 : Variation temporelle des diamètres ovocytaires chez *R. decussatus*, *in situ*.

1.3.1.4. Évolution des stades reproductifs

L'évolution des stades reproductifs chez les femelles de *R. decussatus* dans le milieu naturel est représentée sur la figure 6. La classification en stades de développement est présentée dans le tableau 3A et la figure 3A. Cette classification constitue un résultat du travail basé sur l'analyse des cohortes ovocytaires et les caractéristiques histologiques de la gonade.

L'analyse des coupes histologiques permet de répartir les ovocytes issus des animaux échantillonnés dans les quatre stades de maturité. Dans le milieu naturel, les ovocytes au stade DG disparaissent en juin et on observe de nouveau en décembre pour le redémarrage d'une gamétogenèse. Ceux en vitellogenèse sont majoritaires pendant les premiers mois de l'année, puis diminuent vers la fin. Les ovocytes matures sont majoritaires pendant la période allant de juin à décembre.

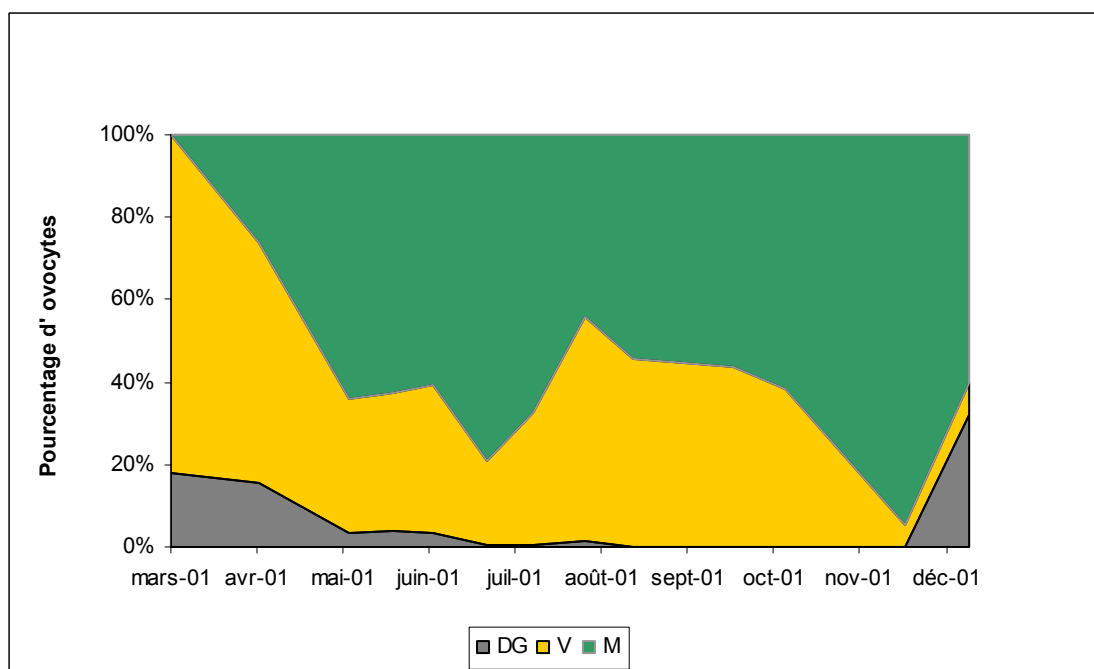


Figure 6 : Évolution des stades de la reproduction chez les femelles de *R. decussatus* dans le milieu naturel. DG : début de gamétogenèse, V : vitellogenèse, M : maturation.

1.3.2. Cycle de reproduction en milieu contrôlé

1.3.2.1. Indice de condition

L'indice de condition a une évolution rapide en milieu contrôlé en hiver 2001 et 2002 (Fig.7A). Une augmentation significative ($p=0,001$) des valeurs est observée dès la deuxième semaine de conditionnement durant les deux années. En 2001, un palier est observé après 3

mois, l'IC étant alors de $13,6 \pm 2,8$. En 2002, un optimum de $13,4 \pm 1,8$ est atteint à partir d'avril.

En conditionnement d'été les fluctuations de l'indice de condition suivent la même évolution qu'en milieu naturel (Fig. 7B). Les valeurs sont assez élevées chez les palourdes avant le conditionnement ($8,9 \pm 2,1$ en 2001) et une baisse significative ($p=0,007$) de l'indice est observée dès septembre, après 6 semaines de conditionnement.

1.3.2.2. Évolution du diamètre ovocytaire moyen

L'évolution du diamètre ovocytaire moyen des palourdes conditionnées en hiver 2002 (Fig. 7A) est corrélée positivement à celle de l'indice de condition ($R^2= 0,65$). Le diamètre ovocytaire augmente significativement au cours du temps ; la valeur la plus élevée est enregistrée après 3 mois de conditionnement, période où les reproducteurs sont en majorité matures.

Au cours du conditionnement estival (Fig. 7B), la baisse des valeurs des diamètres ovocytaires moyens au cours des premières semaines de conditionnement est significative ($p=0,001$). Les géniteurs sont en maturation avancée et émettent leurs produits génitaux à la suite de n'importe quelle variation des paramètres environnementaux (choc thermique par exemple).

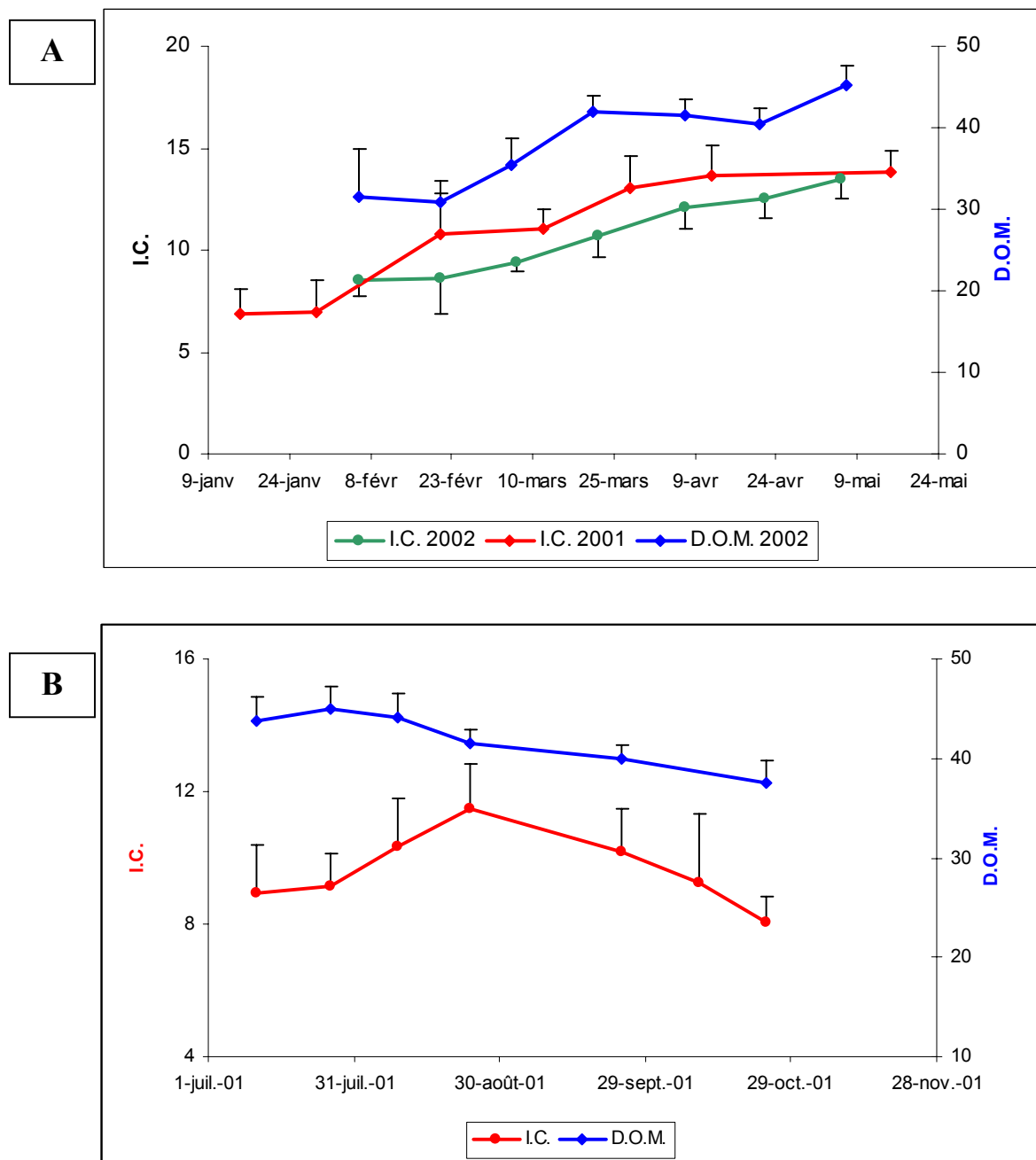


Figure 7 : A/ Variation de l'indice de condition chez *R. decussatus* en conditionnement d'hiver 2001 et 2002 et celle du diamètre ovocytaire moyen en 2002. B/ Évolution comparée de l'indice de condition (IC) et du diamètre ovocytaire moyen (DOM) chez *R. decussatus* en conditionnement d'été 2001 (moyenne +/- intervalle de confiance à 95%).

1.3.2.3. Distribution des fréquences des diamètres ovocytaires

Dans les résultats qui suivent nous avons choisi de ne considérer que ceux de l'hiver 2002 et l'été 2001 pour une meilleure compréhension.

Les animaux conditionnés en hiver 2002 sont capables de produire un pourcentage important (40%) d'ovocytes en vitellogenèse dès février et des ovocytes matures en mars (Fig. 8A). A partir de cette période, les reproducteurs répondent positivement, par émission des gamètes, aux chocs thermiques subis.

Les gonades des palourdes conditionnées en été 2001 contiennent à leur arrivée en écloserie (en juillet) des ovocytes matures (Fig. 8B). La distribution des fréquences ovocytaires en juin, juillet et août correspond parfaitement à celle du milieu naturel : toutes les femelles présentent des ovocytes matures en juillet. En août, un étalement des modes vers des diamètres plus faibles est constaté, les palourdes émettant les ovocytes matures et gardant ceux en cours de vitellogenèse.

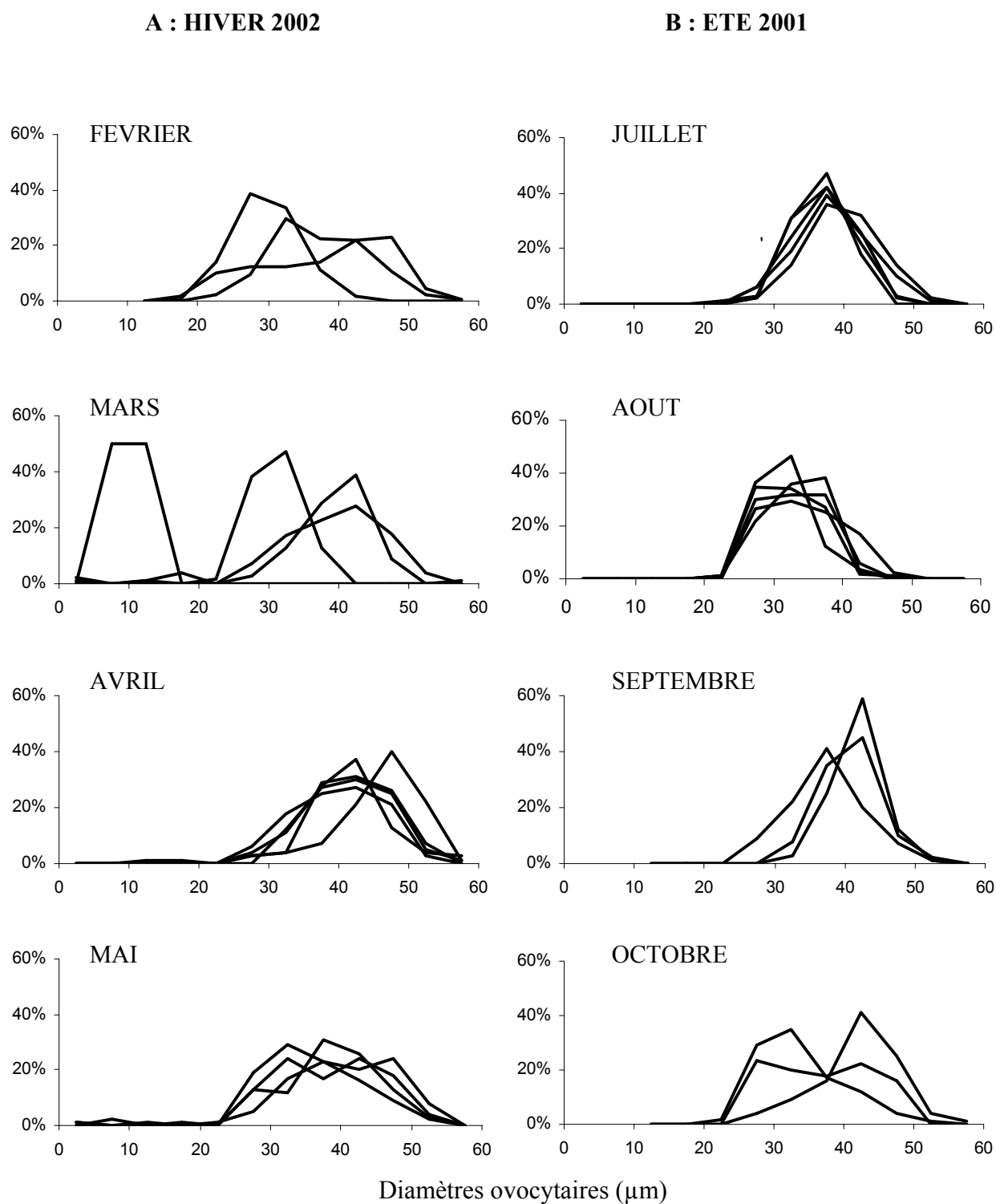


Figure 8 : Variation temporelle des diamètres ovocytaires chez *R. decussatus* en conditionnement d'hiver (A) et en conditionnement d'été (B).

1.3.2.4. Évolution des stades reproductifs

L'évolution des stades reproductifs chez les femelles de *R. decussatus* en conditionnement d'hiver 2002 et d'été 2001 est représentée sur la figure 9. Pour le conditionnement d'hiver 2002 (Fig. 9A), les ovocytes au stade DG disparaissent en mars, laissant la place à des ovocytes en vitellogenèse qui représentent 70% des cellules sexuelles en février. Les ovocytes matures représentent 80% dès la fin mars.

Une absence d'ovocytes en début de gamétogenèse est observée chez les palourdes conditionnées en été 2001 (Fig. 9B). Les ovocytes matures représentent 70% avant l'arrivée en écloserie. Après 5 semaines de conditionnement, le pourcentage des ovocytes matures est à son maximum (100%), période où les reproducteurs répondent positivement, par émission des gamètes, aux chocs thermiques subis.

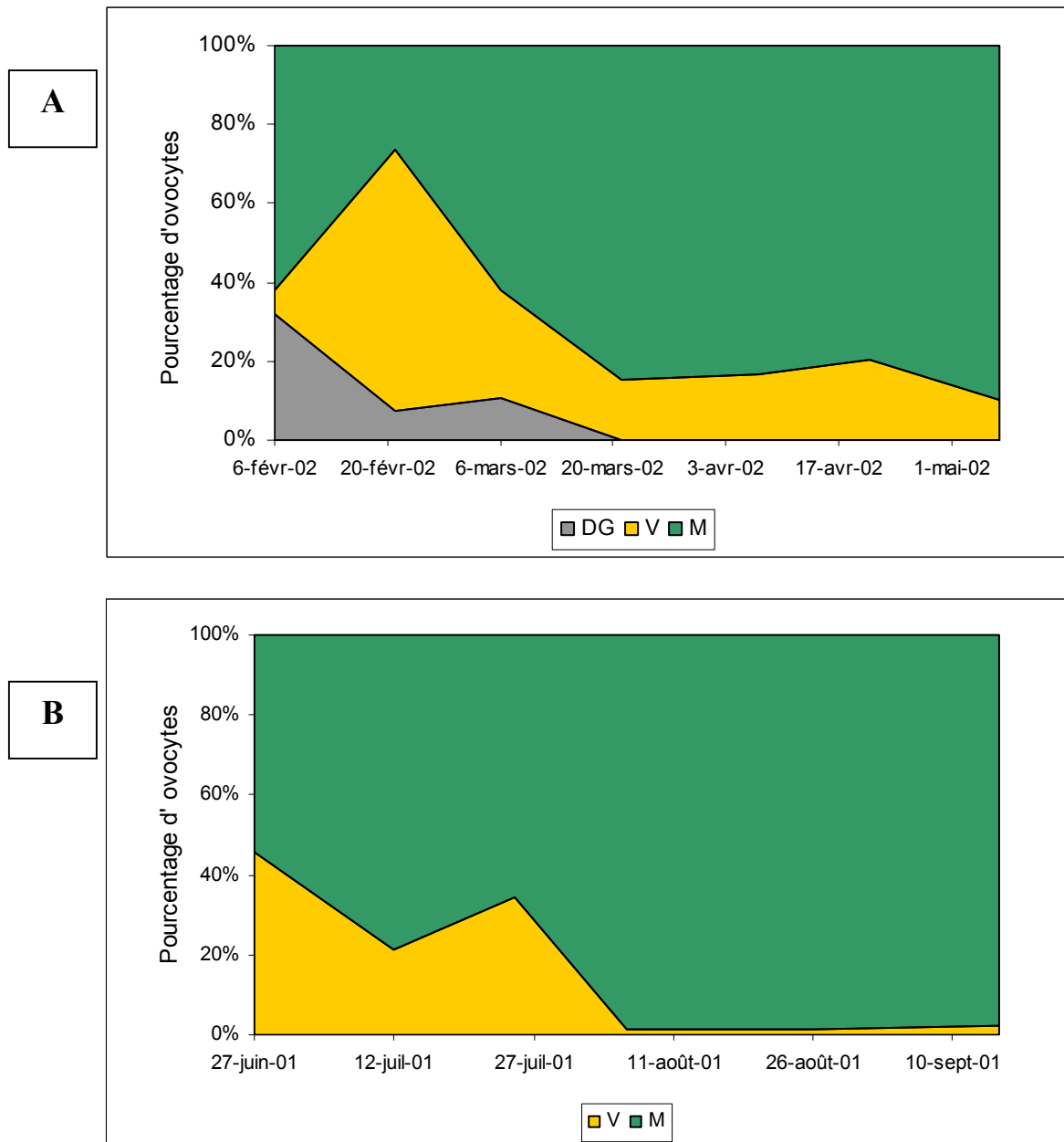


Figure 9 : A : Évolution des stades de la reproduction chez les femelles de *R. decussatus* en conditionnement d'hiver 2002. B : Évolution des stades de la reproduction chez les femelles de *R. decussatus* en conditionnement d'été 2001. DG : début de gamétogenèse, V : vitellogenèse, M : maturation.

1.4. Discussion et conclusion

Afin de répondre aux objectifs qui consistent à connaître le cycle sexuel de *R. decussatus* en milieu naturel et en milieu contrôlé, à définir les critères d'évaluation de leur maturité et à évaluer l'apport positif du conditionnement dans la réussite de la reproduction artificielle, nous avons utilisé deux approches : qualitative par analyse histologique et semi-quantitative par suivi d'un indice de condition et analyse d'image. Il s'agit d'approches complémentaires et indispensables dont les résultats, plus ou moins détaillés suivant la méthode, sont convergents.

Cycle naturel

Selon nos résultats, le cycle sexuel de *R. decussatus* en Tunisie ne présente pas de fort ralentissement durant l'année, la gonade est constamment en activité, même si celle-ci est lente pendant certaines périodes comme en janvier et février où débute la gamétogenèse. Dès mars-avril l'activité gonadique s'accélère et reste soutenue jusqu'en novembre-décembre, due vraisemblablement à l'élévation de température de l'eau qui passe de 12°C en janvier à 28°C en août dans la zone d'étude (Fig. 4) et à l'abondance trophique procurée par les efflorescences phytoplanctoniques. On note trois périodes d'émissions gamétiques principales : la première commence début juin, la deuxième début juillet pour s'achever en octobre et la troisième en décembre (Fig.4). D'une façon générale, il s'agit d'une période continue d'émission gamétique s'étalant de juin jusqu'en décembre avec un intervalle de temps irrégulier entre les émissions. L'étude du cycle de reproduction par l'analyse des cohortes ovocytaires (Fig. 5) confirme et renforce les résultats précédents. En effet, il s'agit d'un cycle polymodal, continu sur toute l'année. La prolifération des ovocytes au stade de début de gamétogenèse ($DOM < 15 \mu m$) commence en janvier et se poursuit jusqu'en avril - mai, et la croissance ovocytaire se déroule jusqu'en juin - juillet ($15 \mu m < DOM < 40 \mu m$). A cette période, les ovocytes atteignent le stade de maturité ($40 \mu m < DOM < 60 \mu m$). Les émissions gamétiques se produisent jusqu'en décembre. Cependant, à partir d'août, on note la présence simultanée d'ovocytes en vitellogenèse et matures. Sachant qu'en juillet la quasi-totalité des femelles sont prêtes à émettre leurs gamètes, ceci indique que les émissions gamétiques sont partielles pendant le mois de juillet et qu'une nouvelle génération de cellules sexuelles est en évolution. On peut penser que les 100% d'ovocytes matures de décembre sont les jeunes générations d'ovocytes d'août qui sont arrivées à maturité après trois à quatre mois.

Cependant, plus vraisemblablement, étant donné les hautes températures (eau à 28°C), on peut considérer que les géniteurs émettent leurs gamètes matures à chaque occasion favorable et renouvellent leurs stocks dans un intervalle de temps réduit, de l'ordre de deux à trois semaines, comme l'a montré Calvez (2003) pour *R. philippinarum* dont le golfe du Morbihan. Selon Lubet (1984), au cours de la période hivernale dite de repos sexuel, il se produit des émissions gamétiques dues au développement de quelques cellules sexuelles dans quelques acini dispersés au sein d'un abondant tissu de réserve. Au cours de notre étude malgré la présence d'ovocytes matures en novembre – décembre et janvier – février, nous n'avons pas décelé d'émission gamétique avant le mois de juin.

Trigui-El Ménif *et al.* (1995) considèrent qu'en dépit de l'extension de son aire de répartition et de ses divers habitats, le cycle sexuel de *R. decussatus* ne présente pas de grandes différences d'une région à l'autre. D'après Lubet (1984), la durée du cycle semble être plus longue dans les régions méridionales comme la Tunisie (Zamouri-Langar, 1991) ou le Maroc (Shafee & Daouadi, 1991), où elle couvrirait pratiquement toute l'année.

Dans la distribution des cohortes ovocytaires chez *R. decussatus*, *in situ* (Fig. 5), il semble y avoir une synchronisation de la gamétogenèse entre les femelles, quelle que soit la période d'étude. Ces résultats diffèrent de ceux de Trigui-El Menif *et al.* (1995) qui ont réalisé leurs travaux dans le site de Gargour (Golfe de Gabès) et qui ont mis en évidence que la gamétogenèse se déroule d'une façon asynchrone pour les populations de *R. decussatus* notamment en fin d'hiver.

En raison de la période étalée des émissions gamétiques observées dans la présente étude, une question s'impose sur la meilleure période de ponte naturelle pour le recrutement. Lubet (1984) considère que, dans le cas de la Tunisie, la première émission printanière semble être la plus importante pour le recrutement puisqu'elle coïncide avec les efflorescences phytoplanctoniques de la saison. Dans notre étude, aucune émission gamétique n'a été décelée avant le mois de juin et la meilleure période de ponte s'avère être celle de décembre puisqu'elle serait à l'origine des post-larves et des juvéniles dont la vie coïncidera avec les efflorescences phytoplanctoniques printanières de l'année suivante. Les émissions gamétiques de juin, juillet et août se déroulent à des températures très élevées de l'ordre de 28°C (Fig. 4), qu'on considère difficilement supportables par les larves de palourde. Pourtant Trigui-El Menif *et al.* (1995) suggèrent que les émissions gamétiques de juin-juillet sont les meilleures, car elles permettent au naissain d'atteindre une taille suffisante pour supporter les mauvaises conditions environnementales de fin d'année.

Les émissions gamétiques observées lors de cette étude sont toutes partielles. Ainsi, après la ponte, il existe toujours un certain nombre d'ovocytes qui n'ont pas été émis et qui vont soit constituer la nouvelle vague d'ovocytes qui seront libérés (cas d'août – décembre, Fig. 5), soit s'atrophier et procurer des métabolites pour le développement de la nouvelle cohorte ovocytaire (Beninger, 1984; Morvan & Ansell, 1988 ; Rodriguez-Moscoso & Arnaiz, 1998)

La température semble être le facteur clé qui contrôle le déroulement de la gamétogenèse de la palourde. Ceci a été montré par plusieurs auteurs pour diverses espèces de bivalves (Loosanoff & Davis, 1963 ; Sastry, 1968 ; Mann, 1979b) dont *Ruditapes philippinarum* (Mann, 1979a). En effet, les températures moyennes enregistrées au cours de l'échantillonnage dans la zone d'étude s'échelonnent entre $12 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en janvier et $27,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en juillet. (Fig. 4), ce qui permet un déroulement de la gamétogenèse pendant une grande partie de l'année.

Reproduction contrôlée

Le suivi du cycle reproducteur d'individus de *R. decussatus* conditionnés durant l'hiver montre l'apport positif de cette méthode sur le déroulement de la gamétogenèse. L'obtention d'ovocytes matures est possible à partir de mars. A cette période, la gonade est au début de gamétogenèse, mais une forte proportion d'ovocytes (60%, Fig. 9A) est déjà mature. Les émissions gamétiques commencent à partir d'avril en conditionnement, alors qu'elles ont lieu en juin en milieu naturel. En conditionnement hivernal, les émissions gamétiques sont partielles, car la gonade renferme au moment des émissions gamétiques des ovocytes aux stades DG, V et M. Au début du conditionnement, il existe dans la gonade des ovocytes résiduels, mais ceci n'empêche ni ne retarde la reprise de la gamétogenèse, contrairement à ce qui a été observé chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, où la reprise n'est possible que lorsque les derniers ovocytes ont disparu (Dupuy *et al.*, 1977). Le cycle est alors accéléré grâce à l'élévation de température et la présence abondante de nourriture ; les femelles produisent donc des gamètes matures en un laps de temps de 4 semaines, en avance de trois mois par rapport au milieu naturel. Zine *et al.* (1998) ont trouvé des résultats similaires pour le conditionnement de *R. philippinarum* où cette dernière nécessite quatre à cinq semaines pour atteindre le stade de maturité des cellules sexuelles, Chávez-Villalba *et al.* (2002a) obtiennent aussi des résultats similaires pour l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*.

Les résultats relatifs au conditionnement d'été montrent qu'il n'existe aucune différence dans la distribution des modes ovocytaires l'évolution du diamètre ovocytaire moyen et l'indice de

condition, entre milieu contrôlé (Fig.7B ; Fig. 8B) et milieu naturel (Fig. 4 ; Fig. 5). L'évolution du cycle sexuel est la même dans les deux cas de figure, les périodes d'émissions gamétiques coïncident parfaitement. Le conditionnement d'été n'apporte donc aucun avantage par rapport à l'utilisation d'animaux issus directement du milieu naturel pour la production de gamètes.

Ainsi, cette étude nous a permis de fournir des résultats essentiels pour la maîtrise du conditionnement de la palourde *R. decussatus*, permettant aux éclosoirs d'évaluer l'état de maturité des géniteurs, de concentrer leurs efforts sur le conditionnement uniquement à certaines périodes de l'année allant de février à mai, ce qui leur permet de gagner autant en temps qu'en coût de production.

Chapitre 2 : Évaluation de la compétence des ovocytes à la fécondation par la sérotonine (5-HT)

2.1. Introduction

Chez les bivalves, en règle générale, les ovocytes sont bloqués dans les ovaires en prophase de la première division de la méiose et celle-ci n'est levée qu'au moment de la ponte. Un deuxième blocage se produit en métaphase I, levé par la fécondation. Dans le cas de *R. decussatus*, lorsqu'en procède à une dissection de la gonade pour la conduite d'un élevage larvaire on n'obtient que des ovocytes bloqués en prophase I et qui sont donc non fécondables. Pour obtenir une poursuite de la méiose et le passage des ovocytes en métaphase I, l'ajout de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) est proposé. En effet, ce régulateur et messager biochimique synthétisé à partir de l'acide aminé L-tryptophane permet la rupture de la vésicule germinative ou GVBD (pour Germinal Vesical Break Down) et la reprise de la méiose. Son intervention provoque l'augmentation du pH intracellulaire et l'expulsion du 1^{er} globule polaire (Kyojuka *et al.*, 1997 ; Colas et Dubé, 1998).

L'objectif de ce chapitre est donc d'évaluer la compétence des ovocytes à la fécondation après action de la sérotonine. Nous nous proposons de déterminer la dose optimale de sérotonine qui permet la rupture de la vésicule germinative et de réussir des fécondations à partir des ovocytes en GVBD obtenus par dissection de la gonade. Ainsi, pour la première fois, nous nous proposons d'établir une relation entre le pourcentage d'ovocytes en GVBD et la maturation des reproducteurs chez cette espèce de bivalve.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Conditions expérimentales

Les expériences de conditionnement des géniteurs de *Ruditapes decussatus*, issus du golfe de Gabès (Tunisie), ont été effectuées en 2001 et 2002 dans l'écloserie expérimentale de Monastir dépendante de l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer (INSTM). Le protocole utilisé est celui qui a été proposé par Medhioub *et al.* (2000) (cf. Chapitre I: Matériels et méthodes). Le conditionnement effectué de juillet à septembre 2001 est dénommé conditionnement d'été, celui de février à mai 2002, le conditionnement d'hiver.

2.2.2. Méthodes utilisées

La gamétogenèse est suivie par examen des coupes histologiques de la gonade tout au long du conditionnement (prélèvements bimensuels) afin de déterminer la période propice pour les essais d'induction de la maturation ovocytaire par la sérotonine.

2.2.2.1. Obtention des gamètes

Les gamètes sont obtenus par dissection de la gonade de 10 palourdes choisies au hasard. Les ovocytes récupérés sont tout d'abord filtrés sur un tamis de 100 μm afin d'éliminer les débris tissulaires, puis concentrés sur un tamis de 30 μm et mis en suspension dans un volume de 250 ml. Trois aliquotes sont récupérés à partir de cette suspension afin de calculer le nombre total d'ovocytes. Les spermatozoïdes sont aussi filtrés et récupérés sur un tamis de 100 μm afin d'éliminer les débris. Ils sont ensuite mis en suspension dans un volume de 100 ml et à une température de 4°C jusqu'au moment de la fécondation.

2.2.2.2. Tests d'induction à la GVBD

Afin de déduire la concentration de sérotonine qui permet d'obtenir le meilleur pourcentage d'ovocytes en GVBD, nous avons testé différentes concentrations allant de 2 à 100 μM en plaçant une ponction d'ovocytes, environ 2000, en contact avec les différentes doses de sérotonine dans des puits de 2 ml d'une plaque de micro-titration 24 puits (1 volume de sérotonine / 1 volume d'ovocyte), en triplica et placés à 20°C. Les différentes concentrations de sérotonine sont obtenues à partir d'une solution initiale de 200 μM obtenue en dissolvant 2g de sulfate de creatinine - sérotonine (Sigma) dans de l'eau distillée. La rupture de la vésicule germinative est évaluée 90 mn après addition de la sérotonine. Les ovocytes en GVBD sont observés directement en microscope optique. Ils présentent une forme régulière et un noyau qui ne peut pas être différencié du cytoplasme (Fig. 10).

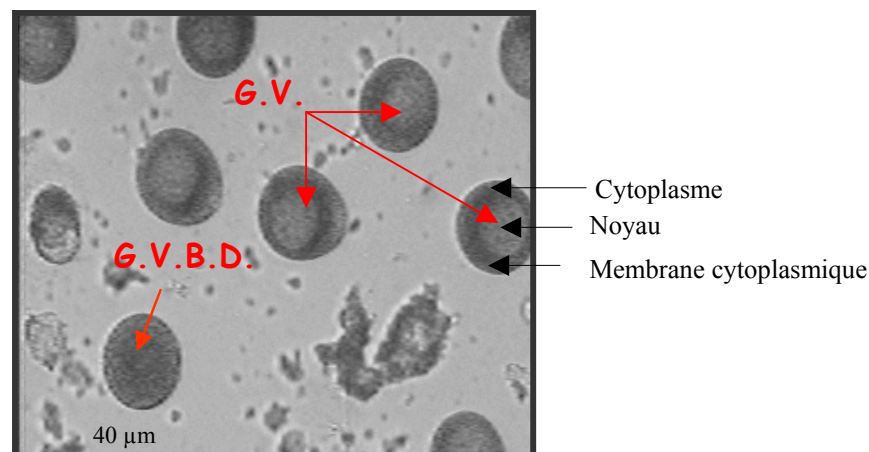


Figure 10 : Ovocytes en GV (noyau en clair, visible, par rapport au continu cellulaire plus foncé) et en GVBD (noyau invisible) observé en microscope optique

Les tests d'induction de la GVBD ont commencé après une semaine pour le conditionnement d'été et 7 semaines pour le conditionnement d'hiver. Ce décalage est dû au fait que pour le conditionnement d'été, les géniteurs avaient une gonade développée dès leur arrivée en éclosérie, par contre, pour le conditionnement d'hiver les palourdes n'étaient qu'en tout début de gamétogenèse

2.2.2.3. Tests de fécondation

Après avoir déterminé la concentration optimale de sérotonine qui permet le meilleur pourcentage d'ovocytes en GVBD, cette dernière a été administrée aux ovocytes obtenus par dissection de la gonade pour lever le premier blocage. Afin de lever le deuxième blocage et obtenir la fécondation, une solution de sperme issue de 1 ou plusieurs mâles, déjà conservée à 4°C, a été administrée. Les ovocytes fécondés sont alors mis dans des bacs cylindro-conique de 30 l avec une aération par le bas afin d'éviter la stagnation des œufs.

24 h plus tard, le taux d'éclosion par rapport aux larves D est estimé, c'est à dire le nombre total de larves, divisé par le nombre total d'ovocytes fécondés (Gérard *et al.*, 1989) ainsi que le taux d'anomalie qui est égale au nombre de larves anormales divisé par le nombre total de larves (Salaün *et al.*, 1991) (Fig. 11).

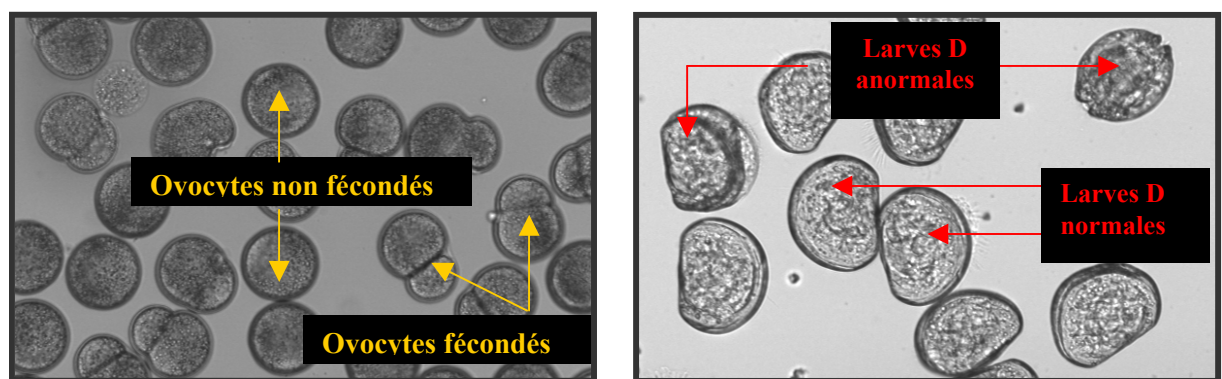


Figure 11 : Ovocytes fécondés, non fécondés, larves D normales et larves D anormales observés au microscope optique

Toutes les expériences de fécondation d'ovocytes débloqués par la sérotonine ont été effectuées parallèlement avec des tests de fécondation d'ovocytes émis à la suite des chocs thermiques. La fécondation ainsi que l'élevage larvaire se sont déroulés en même temps et dans les mêmes conditions pour les différents lots.

2.2.3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont traités à l'aide du logiciel XSTAT, des tests non paramétriques (test de Kruskal-Wallis) sont utilisés afin de déterminer si la différence entre les moyennes est significative ou pas.

2.3. Résultats

2.3.1. Induction à la GVBD

2.3.1.1. Effet de la sérotonine

Le pourcentage d'ovocytes en GVBD diffère significativement ($P < 0.05$) avec la concentration de sérotonine utilisée (Fig. 12). En absence de sérotonine le pourcentage d'ovocytes en GVBD est approximativement de 22% ; il augmente significativement avec la dose de sérotonine, le maximum est atteint avec 20 μM , il est de l'ordre de 67%. Au delà de cette dose le pourcentages d'ovocyte en GVBD chute significativement. À 40 μM de sérotonine, le pourcentage de GVBD est égal à celui enregistré en absence de sérotonine (22%) et à 100 μM de sérotonine, le pourcentage de GVBD est nul.

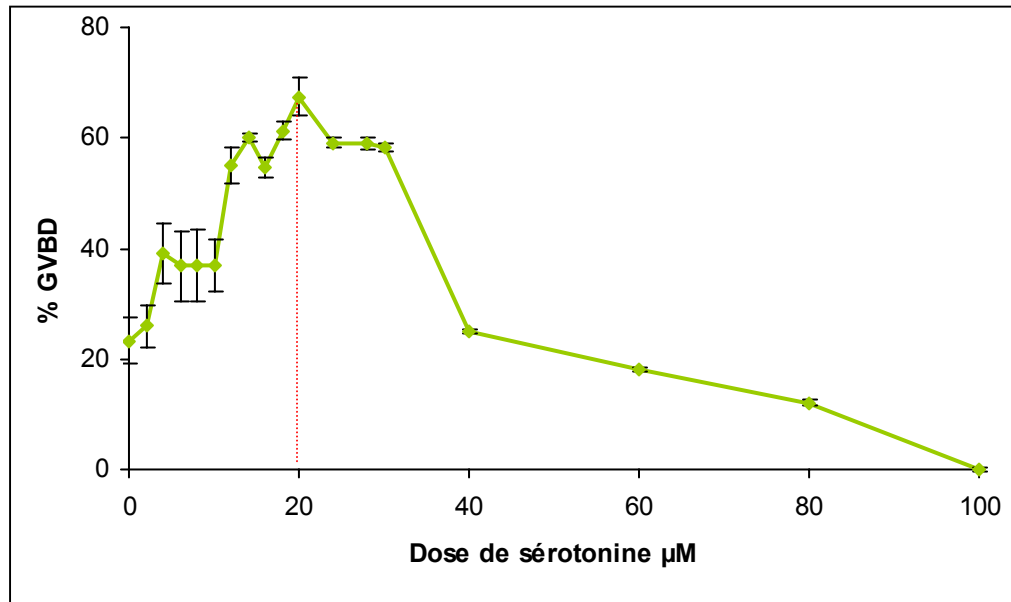


Figure 12 : Variation du pourcentage de GVBD en fonction de la concentration de sérotonine (5-HT) (moyenne \pm Intervalle de confiance).

2.3.1.2. Effet du temps

Sur la figure 13 sont présentés les variations du pourcentage d'ovocytes en GVBD en fonction du temps, respectivement pour l'année 2001 et 2002 pour une concentration de 20 μM de sérotonine. Lors du conditionnement d'été (2001) le pourcentage des ovocytes en GVBD augmente significativement ($p < 0.05$) de 20% à 77% après 4 semaines de conditionnement. A partir de $61 \pm 5,1\%$ d'ovocytes en GVBD les palourdes émettent spontanément leurs gamètes dans les bacs. Pour le conditionnement d'hiver (2002), le pourcentage d'ovocytes en GVBD

augmente significativement ($p < 0.05$) de 25% à 68% après 6 semaines de conditionnement. À partir de $46 \pm 0,4\%$ les palourdes ont répondu positivement aux chocs thermiques exercés pour provoquer l'émission des gamètes.

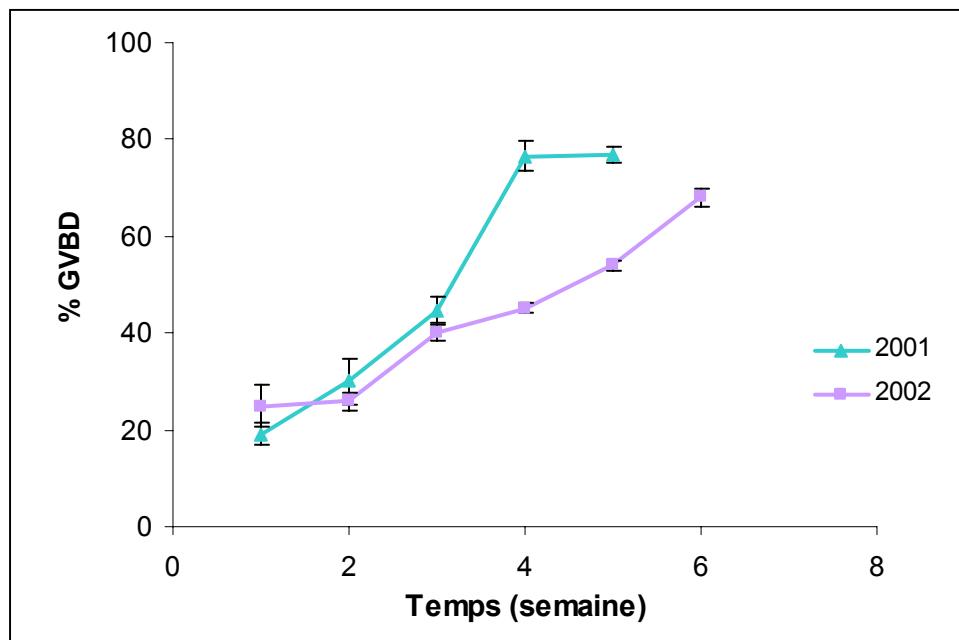


Figure 13 : Variation du pourcentage des ovocytes en GVBD en 2001 et 2002, en fonction du temps

2.3.2. Tests de fécondation

Le taux de fécondation des ovocytes obtenus par dissection est faible par rapport à celui obtenu par choc thermique : respectivement $26 \pm 6\%$ et $92 \pm 0,5\%$. Le taux d'éclosion des ovocytes obtenus par stripping est aussi faible par rapport à celui obtenu par choc thermique : respectivement $7,5 \pm 5,7\%$ et $65 \pm 3\%$. En outre le taux d'anomalie de larves D obtenus à partir d'ovocytes strippés est très élevé (93%). (Tab. 4/5)

Inducteur de la GVBD : sérotonine (20 μ M)	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyennes (\pm Intervalle de confiance)
Taux de fécondation 5 (%)	15	38	25	$26 \pm 4,5$
Taux d'éclosion (%)	2	12	8	$7,3 \pm 3,7$
Taux d'anomalie (%)	98	86	94	$92,6 \pm 1,2$

Tableau 4 : Taux de fécondation, taux d'éclosion et taux d'anomalie des ovocytes débloqués par la sérotonine.

Inducteur de la GVBD : Choc thermique	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyennes (± Intervalle de confiance)
Taux de fécondation (%)	90	92	94	92 ± 0,4
Taux d'éclosion (%)	80	58	57	65 ± 3,1
Taux d'anomalie (%)	20	42	41	34,3 ± 4,1

Tableau 5 : Taux de fécondation, taux d'éclosion et taux d'anomalie des ovocytes débloqués spontanément par choc thermique.

2.4. Discussion et conclusion

L'obtention des gamètes matures par dissection de la gonade, ou stripping, est un moyen rapide et efficace de réaliser un élevage larvaire. Cette technique permet ainsi d'évaluer l'état de maturité des géniteurs, réussir si les gamètes sont matures les élevages larvaires, faire tourner l'écloserie à temps déterminé et améliorer les techniques d'élevages.

Ces techniques sont pratiquées chez les espèces dont les ovocytes sont directement fécondables à la suite d'une dissection de la gonade, comme chez l'huître creuse *C. gigas*. Chez les espèces qui présentent des ovocytes bloqués lors de la dissection de la gonade comme les palourdes *R. philippinarum*, *R. decussatus* (Osanai & Kuraishi, 1988, Guerrier *et al.*, 1993) et *Spisula solidissima* (Masseau *et al.*, 1998 ; Yi *et al.*, 1998), l'intervention de la sérotonine est un procédé qui permet de lever ce blocage et réussir la fécondation.

Selon les résultats de Osanai (1985), chez *C. gigas*, le pourcentage des ovocytes en GVBD augmente fortement dans de l'eau de mer contenant 1 μM de sérotonine. La rupture de la vésicule germinative est observée dès la 10^{ème} minute d'incubation, un maximum de 100 % est atteint en environ 20 à 30 minutes. Selon Moreau et Leclerc (1999), l'ajout de 10 μM de sérotonine au milieu extérieur où baignent les ovocytes issus d'un stripping, permet la reprise de la méiose en environ 20 minutes à 20°C, le maximum d'ovocytes en GVBD, de 90 %, est obtenu après 45 minutes. Afin d'inhiber le passage spontané des ovocytes en GVBD de l'eau de mer acide (pH = 4 - 6,5) est utilisée au moment de la dissection de la gonade.

Chez *R. philippinarum* la reprise de la méiose est enregistrée après l'ajout de 10 μM de sérotonine dans le milieu extérieur à 21°C, le maximum d'ovocytes en GVBD, 91,7 %, est obtenu après 87 minutes (Osanai & Kuraishi, 1988). Chez le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha* la reprise de la méiose et l'obtention des ovocytes en GVBD sont possibles 30 mn après l'addition de 10⁻³M de sérotonine à 23°C (Fong *et al.*, 1994a). En effet 5 à 10 minutes après l'addition de 5-HT, le processus de la maturation ovocytaire est déclenchée (Fong *et al.*, 1994a). Chez *Mytilus galloprovincialis* les ovocytes restent insensibles aussi bien à l'eau de mer ordinaire qu'à la sérotonine, suite à une dissection de la gonade, les gamètes femelles ne peuvent pas être fécondés.

Ram *et al.* (1993) ont montré que l'intervention de la sérotonine par injection ou en application externe déclenche aussi l'émission des gamètes chez les mâles et les femelles de *D. polymorpha*. Chez les mâles, les critères de la maturation gonadique sont corrélés positivement avec les probabilités d'émission, tandis que chez les femelles, les critères de la maturation ne sont pas toujours corrélés avec les probabilités d'émission : plusieurs femelles

d'apparence mature peuvent avoir des ovocytes en atresie. Mentionnons par ailleurs que chez un crustacé, la crevette blanche *Penaeus vannamei*, la ponte obtenue par injection de la sérotonine donne d'excellents résultats qui sont significativement identiques à ceux obtenus par ablation de l'œil (Ali & Vaca, 2000 ; Vaca & Alfaro, 2000).

La sérotonine joue un rôle important dans le contrôle de la reproduction chez de nombreux animaux. Chez les mollusques, l'injection de 5-HT induit la maturation ovocytaire et l'émission des gamètes chez plusieurs espèces de bivalves (O'Connor & Heasman, 1995 ; Madrones, 1997 ; Fong *et al.*, 2003 ; Louro *et al.*, 2003). La sérotonine a été détectée dans les gonades des bivalves où ces organes présentent une grande affinité aux récepteurs de 5-HT (Fong *et al.*, 1994b ; Krantic *et al.*, 1993). En plus de son effet sur la reproduction, elle joue un rôle important dans la respiration, la nutrition, la digestion et l'excrétion chez les mollusques bivalves (Croll *et al.*, 1995). Catapane (1983) et Uhler *et al.* (2000) ont montré que la sérotonine agit aussi sur le mouvement des cils des cellules branchiales des bivalves. Par ailleurs, elle induit la métamorphose chez les larves du gastéropode, *Ilyanassa obsoleta* (Couper & Leise, 1996). Enfin, elle contrôle la sécrétion de la gonadotrophine chez certains vertébrés comme les mâles prépubères des rats (Pinilla *et al.*, 1994) et elle a un effet antidépresseur pour le genre humain (Gardier *et al.*, 2001).

Chez certains bivalves, la reprise de la méiose est sous la dépendance d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Cette variation de Ca^{2+} résulte d'une libération de ces ions à partir des stocks intracellulaires (Abdelmajid *et al.*, 1993, Colas & Dubé, 1998). C'est le cas de *S. solidissima* (Schuetz, 1975) et *R. philippinarum* (Osanai & Kuraishi, 1988) où l'ajout de 10 μM de Ca^{2+} dans le milieu extérieur, à 19°C, permet l'obtention de 95,8% d'ovocytes en GVBD après 60 minutes d'incubation. Par contre chez *C. gigas*, le taux d'ovocytes en GVBD dans de l'eau de mer dépourvue de Ca^{2+} est plus important que celui retenu dans de l'eau de mer ordinaire. L'absence de Ca^{2+} n'empêche en aucun cas la reprise de la méiose. L'ajout de calcium n'induit pas la GVBD, mais stimule la reprise de la méiose après blocage en métaphase I (Osanai, 1985 ; Osanai & Kuraishi, 1988).

Haneji et Koide (1988) et Varaksin *et al.* (1992) ont montré que la maturation ovocytaire chez le genre *Spisula* peut aussi être provoquée par l'ajout de la sérotonine, par l'intermédiaire de la phosphoprotéine. Les résultats obtenus sur les nématodes *Cerebratulus lacteus* et *Micrura alaskensis*, par Strickers et Smythe (2000) montrent que la maturation ovocytaire chez ces espèces est déclenchée aussi bien en eau de mer artificielle contenant du calcium (suggérant ainsi que le flux extérieur de calcium facilite la maturation) qu'en présence de la sérotonine.

Jusqu'à présent aucune étude n'avait encore été réalisée sur la maturation ovocytaire pouvant être induite par la sérotonine chez *R. decussatus*, en milieu contrôlé. Nous avons ainsi montré que l'ajout de 20 μ M de sérotonine au milieu extérieur permet la reprise de la méiose et le passage des ovocytes en GV en GVBD en environ 90 minutes à 20°C. Le maximum de réussite étant de 67%. Par ailleurs, nous avons aussi pu évaluer la compétence des ovocytes en GVBD à la fécondation. En effet plus les géniteurs entrent en maturation plus le pourcentage des ovocytes en GVBD augmente. A partir d'un seuil estimé à 46% d'ovocytes en GVBD les géniteurs placés en milieu contrôlé répondent positivement aux chocs thermiques subis. Ceci nous permet d'estimer ce pourcentage comme un critère d'évaluation des ovocytes à la fécondation, néanmoins les essais de fécondation de ces ovocytes GVBD par le biais de la sérotonine ne présentent pas de résultats satisfaisants (Tab. 4). Ceci nous incite alors à chercher d'autres intervenants faisant augmenter le taux de sérotonine au sein de l'animal avant la dissection de la gonade afin d'obtenir des ovocytes fécondables après un stripping. Comme par exemple l'utilisation du prozac, ou hydrochlorure de fluoxétine, qui représente un inhibiteur de recapture sélective de la sérotonine, permettant ainsi d'augmenter la concentration intrasynaptique de ce régulateur (Gardier *et al.*, 2001). Le prozac est alors considéré comme étant le plus puissant agent inducteur de l'émission gamétique chez les mollusques bivalves capable d'agir sur les mécanismes sérotonergiques sans utilisation de 5-HT (Fong, 1998 ; Fong *et al.*, 1998 ; Honkoop *et al.*, 1999 ; Cunha & Machado, 2001).

Les résultats de notre étude suggèrent l'utilisation de la sérotonine en milieu contrôlé comme un moyen d'évaluation de la compétence des ovocytes à la fécondation chez *R. decussatus*. En se basant sur le pourcentage des ovocytes en GVBD on peut savoir si l'on doit procéder ou pas à la réalisation de l'élevage larvaire des palourdes avant utilisation des tests des chocs thermiques.

Chapitre 3 : Évaluation des paramètres immunitaires de *R. decussatus in situ* et en conditionnement : relation avec son cycle sexuel.

3. 1. Introduction

Le système de défense chez les bivalves est assuré essentiellement par l'hémolymphe (liquide circulant interne) et par les fluides extrapalléaux (situés entre le manteau et la coquille). Ces deux fluides contiennent des facteurs cellulaires, les hémocytes, et une panoplie de facteurs humoraux assurant l'immunité (Paillard *et al.*, 1996 ; Allam, 1998 ; Allam & Paillard, 1998 ; Allam *et al.*, 2000, 2001).

Deux types majeurs d'hémocytes figurent dans la défense cellulaire chez les bivalves : les hyalinocytes ou cellules non granuleuses et les cellules granuleuses ou granulocytes qui assurent les phénomènes de phagocytose et encapsulation (Auffret, 1988, 1989 ; Lopez *et al.*, 1997). Cinq types cellulaires chez les palourdes, *R. philippinarum* et *R. decussatus*, ont été mis en évidence dont les hyalinocytes, les granulocytes neutrophiles, les petites hémocytes basophiles (petites cellules sphériques avec un petit et un grand noyau), les cellules multinucléées (grandes cellules avec 2 noyaux ou plus dans le cytoplasme) et les cellules chargées en particules (cellules avec certaines inclusions dans le cytoplasme reflétant leur activité macrophage) (Auffret & Oubella, 1994 ; Oubella, 1996). Les hyalinocytes et les granulocytes sont les principales populations hémocytaires, qui présentent à elles seules respectivement 55 et 39 % du nombre total d'hémocytes circulants. Les autres types cellulaires sont cependant moins représentés (Oubella *et al.*, 1996 ; Allam & Paillard, 1998). En se basant sur les études morpho-fonctionnelles récentes chez *R. philippinarum*, Cima et collaborateurs (2000) ont démontré l'existence de 4 types d'hémocytes : les granulocytes, les hyalinocytes, les hémoblastes (petites cellules indifférenciées) et les cellules séreuses. Les granulocytes et les hyalinocytes présentent à elles seules entre 80 et 90% du nombre total d'hémocytes circulants.

Les hémocytes et les facteurs humoraux jouent de nombreux rôles complémentaires au sein de l'organisme. Au delà de leurs fonctions immunitaires, ils sont impliqués dans la digestion, le transport de métabolites (Feng *et al.*, 1977 ; Cheng, 1981), l'excrétion (Cheng *et al.*, 1969), la réparation des blessures tissulaires (Ruddel, 1971 ; Sparks & Morado, 1988) et ceux de la coquille (Wagge, 1955 ; Dunachie, 1963 ; Beedham, 1965)

Pour ces différents auteurs, les changements cycliques de la concentration en hémocytes circulants (CHC) pourraient résulter de l'action d'une panoplie de facteurs : des facteurs internes et des facteurs externes.

Pour les facteurs internes, certaines activités physiologiques, comme la reproduction, nécessitent d'importantes concentrations en métabolites véhiculés au sein de l'hémolymph. En effet, des modifications des paramètres immunitaires ont pu être associées à certaines périodes du cycle reproducteur (Fisher & Newell, 1986). Ainsi en période de gamétogenèse, Olivier et Fisher (1995, 1999) et Fisher *et al.* (1996) ont montré chez *C. virginica* une forte mobilisation hémocytaire dans le compartiment circulatoire pour l'approvisionnement des métabolites énergétiques des gonades.

Les paramètres cellulaires de l'hémolymph (nombre, type et activité hémocytaires) peuvent être aussi modulés par des facteurs externes tels que la température, la salinité, la disponibilité trophique, les polluants et les agents pathogènes. En effet, une augmentation de la température accroît l'activité hémocytaire, chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas* et la palourde, *R. philipinarum*, ce qui leur permet d'avoir une meilleure capacité de lutter contre certains agents pathogènes psychrophiles et se rétablir plus vite, mais une température très élevée peut aussi stresser l'animal et induire une baisse de la viabilité des hémocytes (Fisher, 1988 ; Fisher *et al.*, 1989 ; Paillard *et al.*, 2004). Les changements de salinité et la disponibilité en aliments induisent aussi des modifications de ces paramètres immunitaires chez ces mêmes bivalves. Un accroissement de l'activité hémocytaire est observé suite à une baisse de salinité (Fisher & Newell, 1986 ; Fisher *et al.*, 1989 ; Auffret & Oubella, 1994) ou suite à un apport nutritif après un jeune prolongé, la diète provoque une réduction progressive de la CHC (Oubella *et al.*, 1996).

De nombreuses études ont révélé des altérations des paramètres cellulaires et biochimiques de l'hémolymph chez divers bivalves, huîtres, palourdes, moules..., exposés aux polluants chimiques comme le cadmium, le cuivre, le tributylétanin (TBT)... (Feng, 1988 ; Fisher, 1988 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Auffret & Oubella, 1994 ; Lorteau *et al.*, 1995 ; Auffret & Oubella, 1997 ; Fisher *et al.*, 2000 ; Olivier *et al.*, 2001) ou à des agents pathogènes, bactéries, virus... (Cheng & Rodrick, 1974 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Paillard *et al.*, 1996, Allam, 1998 ; Allam *et al.*, 2001 ; Paillard *et al.*, 2004). La présence de contaminants dans l'eau ou l'intervention d'un agent pathogène induit soit l'augmentation de CHC (mobilisation des hémocytes dans le compartiment circulatoire pour le processus de détoxification) ou la diminution de la CHC (mortalité cellulaire). Ces mêmes facteurs pourraient induire une

hypersynthèse d'enzymes lysosomales et leur libération dans la fraction sérique de l'hémolymph qui peut être considérée comme un processus de défense à médiation humorale agissant contre les agents pathogènes ayant envahi l'hôte (Cheng & Rodrick, 1974 ; Chu, 1988 ; Cheng, 1992 ; Allam & Paillard, 1998, Paillard *et al.*, 2004). Les protéines sériques ont aussi un rôle anti-microbien, la diminution de leur concentration dans l'hémolymph indique l'altération des conditions physiologiques par la présence d'agent pathogène, comme le cas de *C. virginica* (Ford, 1986). Néanmoins, elles sont aussi impliquées dans le métabolisme cellulaire et général de l'organisme, notamment le transfert de protéines vers les organes ou transfert des réserves vers les gonades (Auffret *et al.*, 1995)

L'objectif de cette étude était de rechercher si des variations des paramètres cellulaires et biochimiques de l'hémolymph pouvaient être associées à des changements physiologiques liés à la reproduction. Pour cela, une étude sur l'évolution des paramètres immunitaires (cellulaires et humoraux) de l'hémolymph a été réalisée en parallèle à celle de la reproduction en milieu naturel et en conditionnement sur les mêmes individus. Cette étude tentera d'établir de nouveaux critères de maturation ovocytaires en se basant sur les paramètres immunitaires.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Matériels biologiques et conditions d'élevages

La mesure des paramètres immunitaires et l'étude du cycle de reproduction ont été effectuées sur les mêmes palourdes, les unes issues du milieu naturel et les autres placées en conditionnement.

Les palourdes issues du milieu naturel ont été récoltées en 2001 dans le golfe de Gabès (site Oued Maltine), mensuellement de février à mai et bimensuellement de juin à septembre (n=20 individus de 30 à 46 mm par prélèvement).

Le conditionnement des palourdes a été réalisé en 2002 :

Le conditionnement hiver- printemps a été effectué du 06 février au 07 mai 2002 à l'écloserie expérimentale de Monastir (Tunisie) suivant le protocole établi par Medhioub *et al.*, (2000) (Cf. Matériels et Méthodes, Chapitre I), 150 individus de 30 à 46 mm, provenant de l'Oued Maltine, ont été placés en bac de conditionnement.

Le conditionnement été - automne a été effectué du 26 juin au 26 septembre 2002 à l'écloserie expérimentale d'Argenton, dépendante de l'Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la MER (IFREMER), Plouzané, suivant le même protocole énoncé précédemment. Les palourdes placées en conditionnement d'été sont originaires de la rade de Brest (150 individus de 30 à 46 mm)

En parallèle, des prélèvements de 20 individus ont été réalisés bimensuellement pendant les périodes de conditionnement.

N.B. Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, le conditionnement hiver – printemps est appelé conditionnement d'hiver et celui de l'été et l'automne est appelé conditionnement d'été

3.2.2. Paramètres étudiés

3.2.2.1. Étude du cycle de reproduction

L'étude de cycle de reproduction a été réalisée par le suivi de l'évolution de l'indice de condition et les mesures des diamètres ovocytaires moyens (Cf. Matériels et Méthodes, Chapitre I).

3.2.2.2. Diagnostic du système immunitaire

Durant cette étude, n'ayant pas la possibilité de traiter du matériel frais par cytométrie en flux en Tunisie, tous les échantillons d'hémolymphe (ceux prélevés en Tunisie durant le conditionnement d'hiver et ceux prélevés en France durant le conditionnement d'été) ont été fixés afin de pouvoir les traiter simultanément et dans les mêmes conditions. De ce fait, nous avons dû limiter notre étude à l'analyse des paramètres non fonctionnels.

Le diagnostic du système immunitaire a donc porté sur :

- 1- Des analyses cellulaires de l'hémolymphe : Concentration Hémocytaire Totale (CHT) et Différentielle (CHD)
- 2- Des analyses biochimiques du sérum : dosage des protéines sériques et mesure de l'activité de la phosphatase acide.

a. Prélèvement de l'hémolymphe

L'hémolymphe a été prélevée selon la méthode décrite par Auffret et Oubella (1995). A l'aide d'une seringue, une aiguille est enfoncée à travers le ligament de la charnière jusqu'à atteindre le muscle adducteur postérieur, où un volume d'hémolymphe pouvant atteindre jusqu'à 1ml est prélevé (Fig. 14). Une goutte est déposée sur une lame et observée au microscope, elle permet d'apprécier la qualité de l'hémolymphe, notamment la concentration cellulaire et la présence d'agrégats. Tous les échantillons prélevés sont filtrés à 80µm. Les échantillons d'hémolymphe présentant des débris (parasites, gamètes ou morceaux de tissus) sont éliminés immédiatement. Chaque prélèvement satisfaisant, d'un volume de 1ml environ est ensuite analysé comme suit (Fig. 15)

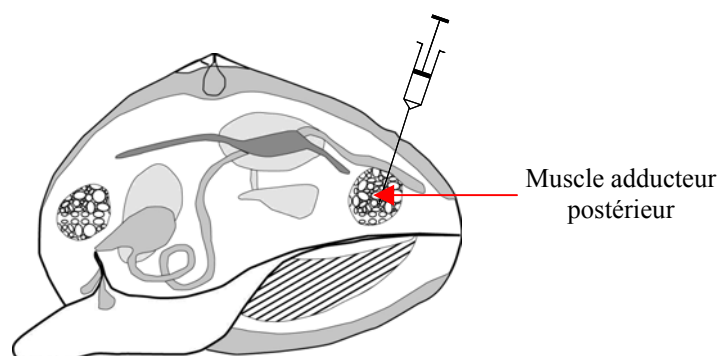


Figure 14 : Méthode de prélèvement de l'hémolymphe

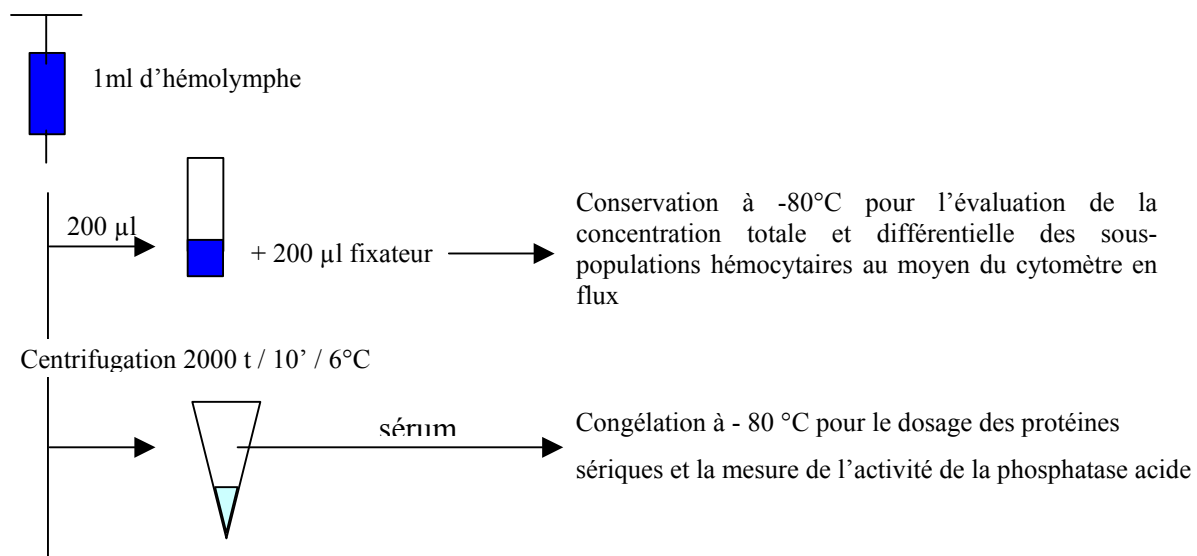


Figure 15 : Traitement des échantillons d'hémolymphe

b. Choix du fixateur

L'intervalle de temps entre les prélèvements d'hémolymphe et le traitement des résultats nous a incité à déterminer au préalable le fixateur adéquat pour la conservation des échantillons. Deux fixateurs ont donc été testés par rapport à l'état frais de l'échantillon, le glutaraldéhyde et le formol, mais aussi leur mode de conservation à long terme, réfrigéré ou congelé. Suite à des analyses statistiques, seuls les échantillons formolés et congelés montraient des caractéristiques proches ou similaires à celles des cellules fraîches. Tous les échantillons d'hémolymphe ont donc été formolés puis conservés au congélateur à -80°C avant les analyses au cytomètre en flux (Annexe 1).

c. Concentration hématocytaire totale (CHT) et différentielle (CHD)

Les concentrations hématocytaires totales et différentielles ont été effectuées au moyen d'un cytomètre en flux : FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San José, CA) couplé à un ordinateur PowerMacG3 équipé d'un logiciel CellQuest qui permet de visualiser l'ensemble des paramètres. Afin de déterminer la concentration cellulaire de chaque échantillon, le débit du cytomètre est d'abord mesuré à chaque série d'expériences (en pesant un tube contenant de l'eau distillée avant et après 10 minutes d'analyse) afin de déterminer le volume analysé pendant un temps connu. Ensuite les échantillons d'hémolymphe sont marqués par le SyberGreen, qui est un marqueur fluorescent possédant une forte affinité pour l'ADN où il se fixe. Ainsi, seules les cellules vivantes ou mortes après fixation seront marquées. Après

incubation de l'hémolymph fixé avec le SyberGreen, les hémocytes émettent une forte fluorescence en vert, détectable en FL1 (intensités de fluorescence) (Fig.16). Au sein des cellules fluorescentes, marquées par le SyberGreen, les types hémocytaires peuvent être différenciés en fonction de leur taille (FSC) et de leur granularité relative (SSC) (Fig. 16). Les données sont alors représentées sous forme biparamétriques (cytogramme) permettant d'apprécier la distribution des différentes populations suivant leurs tailles (FSC), leurs complexités (SSC) et leurs intensités de fluorescence (FL1). Les mesures réalisées sont en débit lent (Low), sur un total de 10000 cellules par échantillon (Annexe 2).

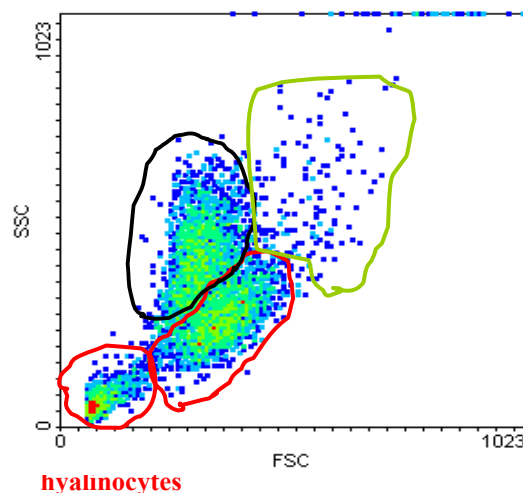


Figure 16 : Cytogramme correspondant uniquement aux cellules fixées marquées par le SyberGreen (hémocytes). Les différents types cellulaires : petit et gros hyalinocytes, granulocytes et agrégats) sont distingués en fonction de leur taille (FSC) et leur complexité (SSC)

Le traitement des données est réalisé au moyen du logiciel WinMDI v.2.8. (Joseph Trotter ©). Les résultats sont analysés selon un traitement caractéristique utilisant des feuilles de calcul Excel modifiées permettant d'obtenir les valeurs de taille et de complexité ainsi que le nombre et l'intensité des cellules fluorescentes. Ainsi, les événements comptés par le cytomètre sont compatibles en tant que cellules hémocytaires.

d. Dosage des protéines sériques

Ce test a été réalisé sur le sérum c'est à dire le surnageant obtenu après centrifugation de l'hémolymph pendant 10 minutes à 2000 tours par minute en suivant la méthodologie décrite par Oubella *et al.* (1996). Sur une microplaque de 96 puits, les échantillons ont été ajoutés en

triplicas ainsi qu'une gamme étalon, après un ajout des réactifs (Kit de dosage BIO-RAD, selon méthode de Lowry *et al.*, 1951), une mesure de densité optique est ensuite réalisée à 620 nm dans un lecteur à microplaque Multiskan (Annexe 3).

e. Mesure de l'activité de la phosphatase acide dans le sérum

Le dosage est basé sur l'hydrolyse d'un ester de phosphatase inorganique n-nitrophényl phosphate ou NPP, en milieu acide (pH = 6,4). Ce test est réalisé sur le sérum, il permet la mesure de l'intégrité cellulaire. Sur une microplaque de 96 puits, les échantillons sont placés en triplicas ainsi que le réactif N-nitrophenyl phosphate à 8 nM, après incubation d'1 heure à l'obscurité, la réaction est stoppée par ajout de NaOH et la densité optique est mesurée à 405 nm. Les valeurs sont comparées à une gamme étalon réalisée à partir de nitrophénol standard et les résultats sont exprimés en activité spécifique : nM de NPP (Annexe 4).

3.2.3. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XSTAT pour déterminer si les différences entre les moyennes étaient significatives. Des tests non paramétriques de comparaison multiple ont été utilisés : le test de Kruskal-Wallis qui permet de comparer l'ensemble des moyennes (cas K échantillons indépendants) et celui de Mann-Whitney qui permet de comparer des moyennes prises 2 à 2 (cas de 2 échantillons indépendants).

3.3. Résultats

3.3.1. Paramètres immunitaires en milieu naturel

3.3.1.1. Paramètres cellulaires

Le suivi en milieu naturel (golfe de Gabès) du système immunitaire de *R. decussatus* durant l'année 2001 a permis de montrer des variations des facteurs cellulaires (Fig. 17 A/B/C).

La concentration hémodocytaire totale (HT) varie beaucoup durant l'année (Fig. 17A), le minimum est observé en avril avec $1,6 \cdot 10^6$ cel./ml ($1 \cdot 10^6$ cel./ml GRA et $0,6 \cdot 10^6$ cel./ml HYA) et le maximum est observé en juillet avec $4,7 \cdot 10^6$ cel./ml ($2,7 \cdot 10^6$ cel./ml GRA et $2 \cdot 10^6$ cel./ml HYA). Une augmentation graduelle est observée entre janvier et mars ($4,1 \cdot 10^6$ cel./ml), suivie d'une chute brutale en avril. Une reprise de la concentration hémodocytaire est observée par la suite en juin où le nombre est à peu près égal à celui enregistré en janvier ($3,3 \cdot 10^6$ cel./ml). Une augmentation significative (M-W, $p < 0.001$) est observée en juillet où la CHT a atteint le maximum ($4,7 \cdot 10^6$ cel./ml), suivie d'une chute importante jusqu'en septembre ($2,5 \cdot 10^6$ cel./ml). La concentration des granulocytes suit la même évolution que celle des hémocytes totaux (HT), tandis que celle des hyalinocytes n'enregistre pas de chute entre juillet et septembre, au contraire une augmentation significative est alors observée (K-W, $p < 0,05$) (Fig. 17A).

Les mesures de la taille (FSC) des hyalinocytes révèlent que celles-ci diminuent significativement (M-W, $p = 0.025$) au début et à la fin du cycle, de mars à avril et d'août à septembre (Fig. 17B). Les variations enregistrées en dehors de ces périodes sont non significatives, il en est de même pour les HT. Celles des granulocytes diminuent (M-W, $p = 0.013$) du 16 avril jusqu'à fin mai et augmentent (M-W, $p = 0.005$) la première quinzaine de juin (Fig. 17B). Les variations en dehors de ces périodes sont non significatives.

Les mesures de la complexité (SSC) des HYA montrent que celles-ci augmentent significativement (M-W, $p = 0.004$) entre le 16 avril et le 20 juillet. Celles des GRA diminuent (M-W, $p = 0.014$) entre le 16 avril et le 15 juin et augmentent entre le 16 juin et le 20 juillet. (Fig. 17C). Les variations en dehors de ces périodes sont non significatives.

3.3.1.2. Relation entre paramètres cellulaires et paramètres de suivi du cycle sexuel

Afin d'établir une relation entre les paramètres immunitaires et les paramètres de suivi du cycle sexuel, une comparaison de leur évolution a été effectuée sur les mêmes individus.

Le suivi de l'évolution de la concentration totale et différentielle des hémocytes et celle du Diamètre Ovocytaire Moyen (DOM) et de l'Indice de Condition (IC) chez *R. decussatus* permet de révéler la présence de trois phases distinctes. Ces phases ont été choisies en se basant sur les variations significatives des paramètres immunitaires :

Phase MN1 : durant cette période du 15 janvier au 16 avril, le diamètre ovocytaire et l'indice de condition augmentent significativement (K-W, $P=0,001$) (Fig. 17D). Les concentrations hémocytaires diminuent, ainsi que la taille des hémocytes totaux, notamment les hyalinocytes, alors que leur complexité varie non significativement.

Phase MN2 : durant cette période du 16 avril au 20 juillet, le DOM et l'IC augmentent significativement (K-W, $P<0,001$). Néanmoins ils enregistrent simultanément une chute la première quinzaine de juin (Fig. 17D). Durant cette période la concentration hémocytaire augmente (totale et différentielle) ainsi que la complexité observée surtout chez les hyalinocytes. La diminution de l'IC et du DOM pendant la première quinzaine de juin et l'augmentation observée à la suite sont corrélées positivement ($R^2= 0,65$, $p<0,001$) avec l'évolution de la complexité des hémocytes totaux, précisément les granulocytes (Fig. 17C)

Phase MN3 : au cours de cette période du 20 juillet au 01 septembre, le DOM diminue significativement ainsi que l'indice de condition (K-W, $P<0,001$). On retrouve la même chose pour la concentration hémocytaire totale et différentielle. La taille et la complexité des hémocytes totaux, précisément les hyalinocytes subissent le même sort (Fig. 17 B/C).

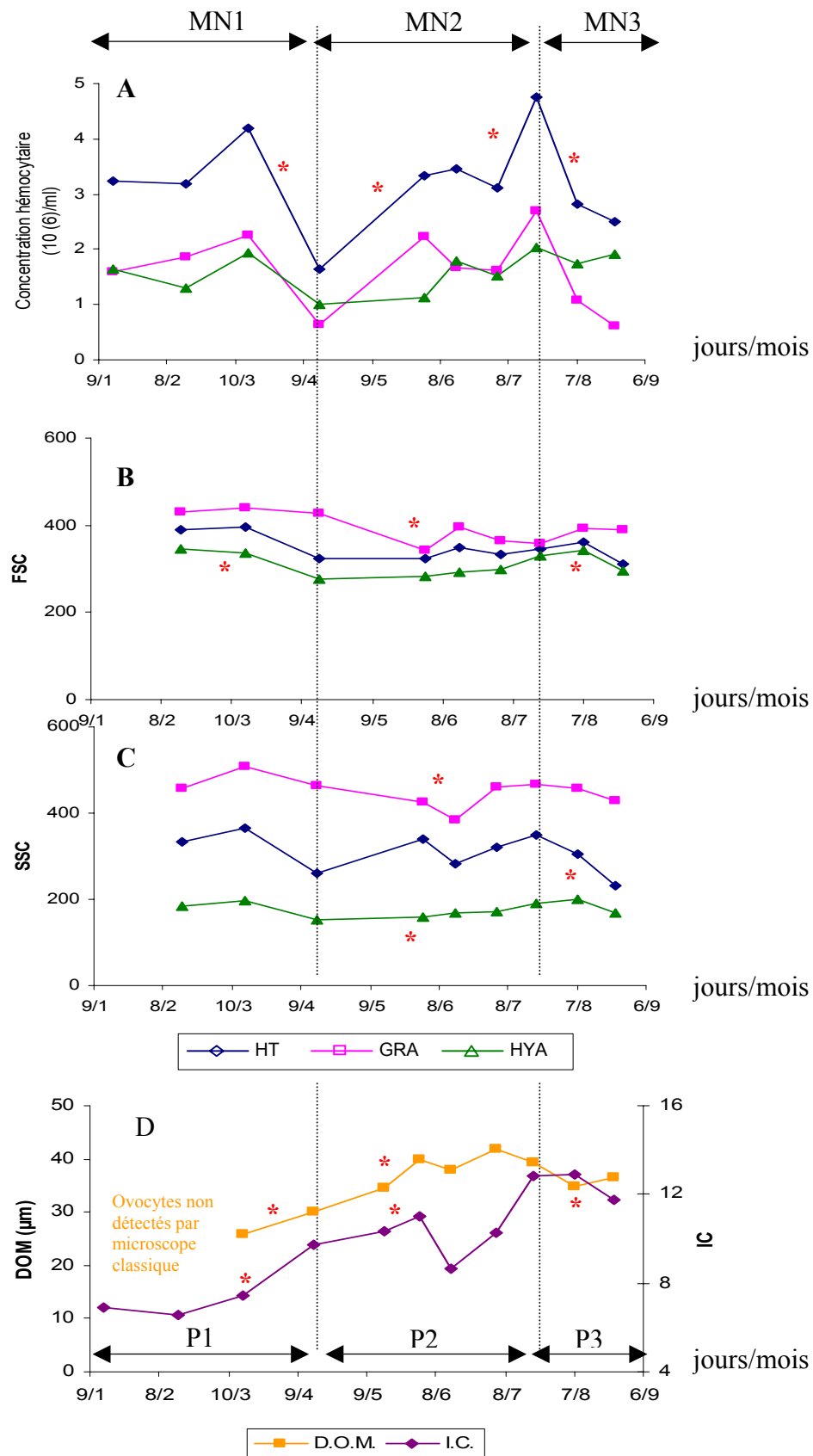


Figure 17 : Évolution des paramètres immunitaires et de suivi du cycle sexuel *in situ* (2001). A : Évolution de la concentration hémocytaire totale et différentielle. B : Évolution de la taille des hémocytes. C : Évolution de la complexité hémocytaire. D : Évolution du diamètre ovocytaire moyen et de l'indice de condition. * : différence significative au seuil α (5%). MN1 : 1^{ère} phase, MN2 : 2^{ème} phase, MN3 : 3^{ème} phase.

3.3.2. Paramètres immunitaires en milieu contrôlé : hiver 2002

3.3.2.1. Paramètres cellulaires

Sur la figure 18 (A/B/C) est représentée l'évolution des paramètres immunitaires de *R. decussatus* placée en conditionnement pendant la période du 06 février au 07 mai 2002.

La variation de la concentration hémodocytaire totale et différentielle (Fig. 18A) montre une baisse graduelle pendant le premier mois du conditionnement du 06 février au 07 mars où la concentration hémodocytaire totale a passé de $1,4 \cdot 10^6$ cel./ml à $0,6 \cdot 10^6$ cel./ml suivie d'une augmentation significative (K-W, $p < 0.05$) par la suite, de mars ($0,6 \cdot 10^6$ cel./ml) à mai ($2,7 \cdot 10^6$ cel./ml).

La taille des populations hémodocytaires (Fig. 18B) augmente significativement (K-W, $p < 0.001$) pendant le premier mois puis varie très peu. La complexité des granulocytes varie non significativement tout au long du conditionnement tandis que celle des hyalinocytes augmente (K-W, $p < 0.001$) après le premier mois du conditionnement (il est de même pour les hémodocytes totaux) (Fig. 18C).

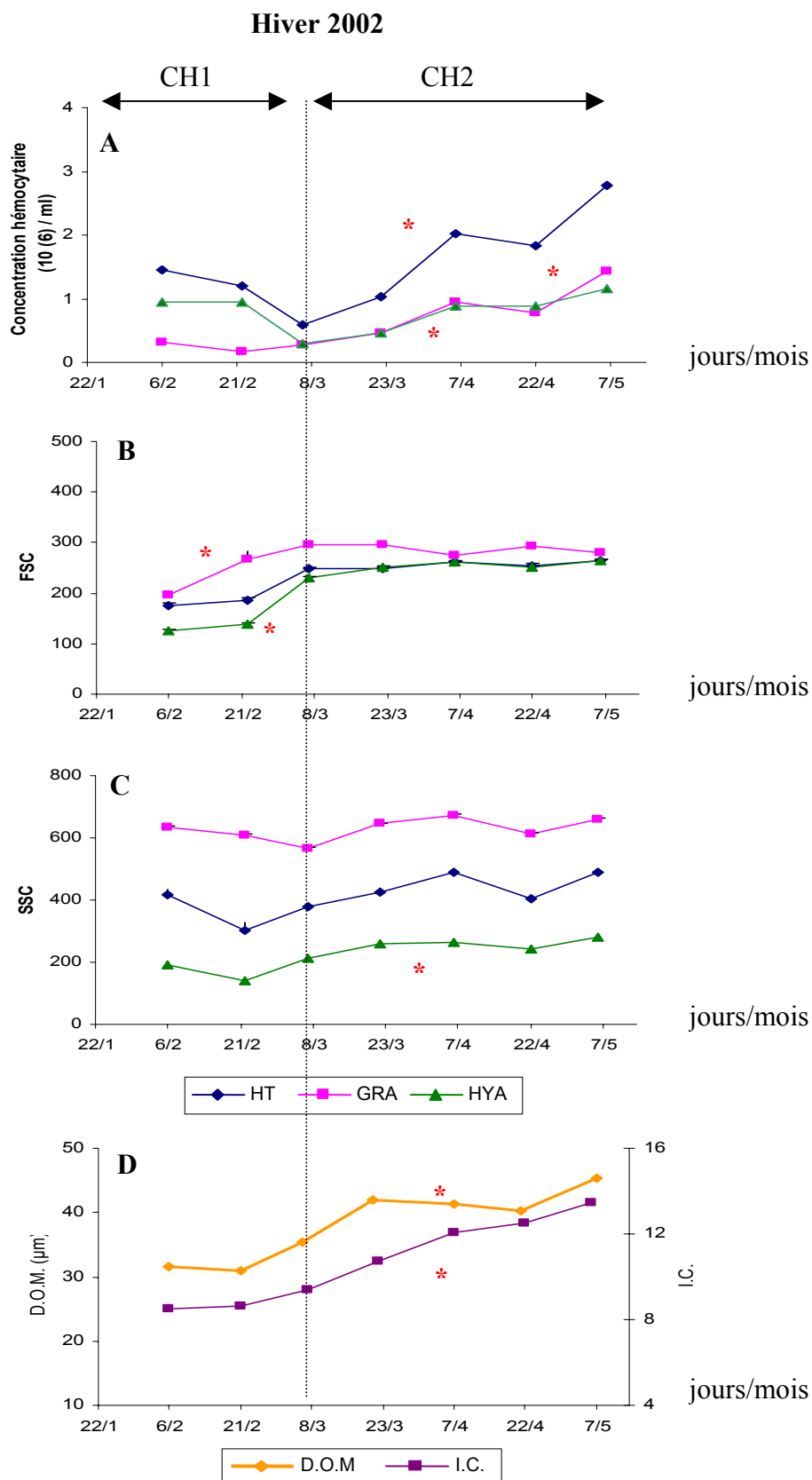


Figure 18 : Évolution des paramètres immunitaires et ceux du suivi du cycle sexuel chez *R. decussatus* en conditionnement d'hiver. A : Évolution de la concentration hématocytaire totale et différentielle. B : Évolution de la taille des hématocytes. C : Évolution de la complexité hématocytaire. D : Évolution du diamètre ovocytaire moyen et de l'indice de condition. * Différence significative au seuil α (5%)
CH1, CH2: 1^{ère} et 2^{ème} phase du Conditionnement d'Hiver.

3.3.2.2. Paramètres biochimiques

La figure 19 présente la variation des taux des protéines sériques et l'évolution de l'activité de la phosphatase acide dans le sérum des palourdes conditionnées en hiver. Le taux des protéines sériques varie non significativement (K-W, $p > 0.264$) pendant le conditionnement. Il est de même pour l'activité de la phosphatase acide qui demeure plus ou moins stable, les variations observées sont non significatives (K-W, $p = 0.07$).

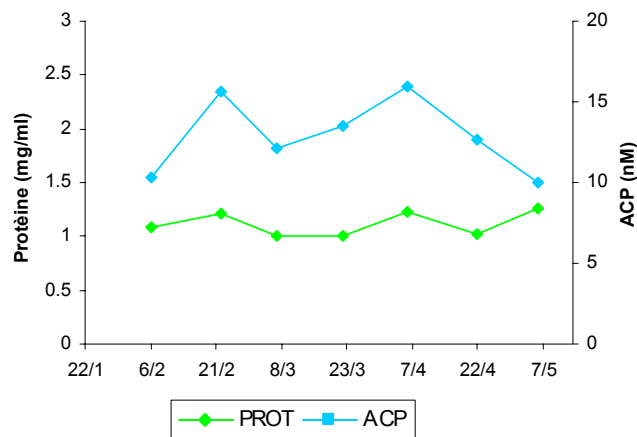


Figure 19 : Variation du taux des protéines sériques et évolution de l'activité de la phosphatase acide chez *R. decussatus* en conditionnement d'hiver * Différence significative au seuil α (5%)

3.3.2.3. Relation entre paramètres immunitaires et paramètre de suivi du cycle sexuel

L'évolution comparative des paramètres immunitaires et ceux permettant de suivre les évolutions du cycle sexuel chez les palourdes conditionnées en hiver nous a permis de différencier deux phases dans le cycle conditionné, qui ont été choisies en se basant sur les variations significatives des paramètres immunitaires :

Phase CH1 : 06 février au 07 mars (1^{er} mois du conditionnement). Durant cette période l'indice de condition et le diamètre ovocytaire moyen augmentent graduellement (Fig. 18D). La concentration des hémocytes varie non significativement, leurs tailles augmentent alors que leurs complexités restent constantes (Fig. 18 B/C)

Phase CH2 : 08 mars au 7 mai. Durant cette période l'indice de condition et le diamètre ovocytaire moyen ont une évolution rapide (Fig. 18D) et significative (K-W, $p=0,001$), les

ovocytes atteignent la taille de maturité (40µm). Au même temps, le nombre des hémocytes augmente (Fig. 18A); la taille et la complexité des populations hémocytaires restent stables, sauf pour les hyalinocytes qui deviennent plus complexes (Fig. 18C). Une corrélation qui peut être considérée comme positive ($R^2= 0,61$, $p<0,001$) est observée entre DOM, IC et concentration hémocytaire.

Toutefois, il semble que les variations non significatives des protéines sériques et de l'activité de la phosphatase acide en conditionnement d'hiver (Fig. 19) ne traduisent pas l'existence d'une relation entre paramètres immunitaires et estimateurs du cycle sexuel.

3.3.3. Paramètres immunitaires en milieu contrôlé : été 2002

3.3.3.1. Paramètres cellulaires

L'évolution des paramètres immunitaires de *R. decussatus* placée en conditionnement d'été du 26 juin au 26 septembre 2002 est présentée dans la figure 20 (A/B/C/). La concentration hémocytaire (Fig. 20A) suit les mêmes variations observées en conditionnement d'hiver, c'est à dire, une augmentation significative (K-W, $p<0.001$) est signalée après le premier mois de conditionnement, où la CHT passe de $0,8.10^6$ cel./ml en juillet à $3,8.10^6$ cel./ml en septembre. Les variations de la taille et de la complexité des populations hémocytaires sont significatives seulement pendant le dernier mois de conditionnement du 26 août au 26 septembre : la taille des granulocytes diminue alors que celle des hyalinocytes augmente (Fig. 20B) et la complexité des deux populations hémocytaires augmente en même temps (Fig. 20C).

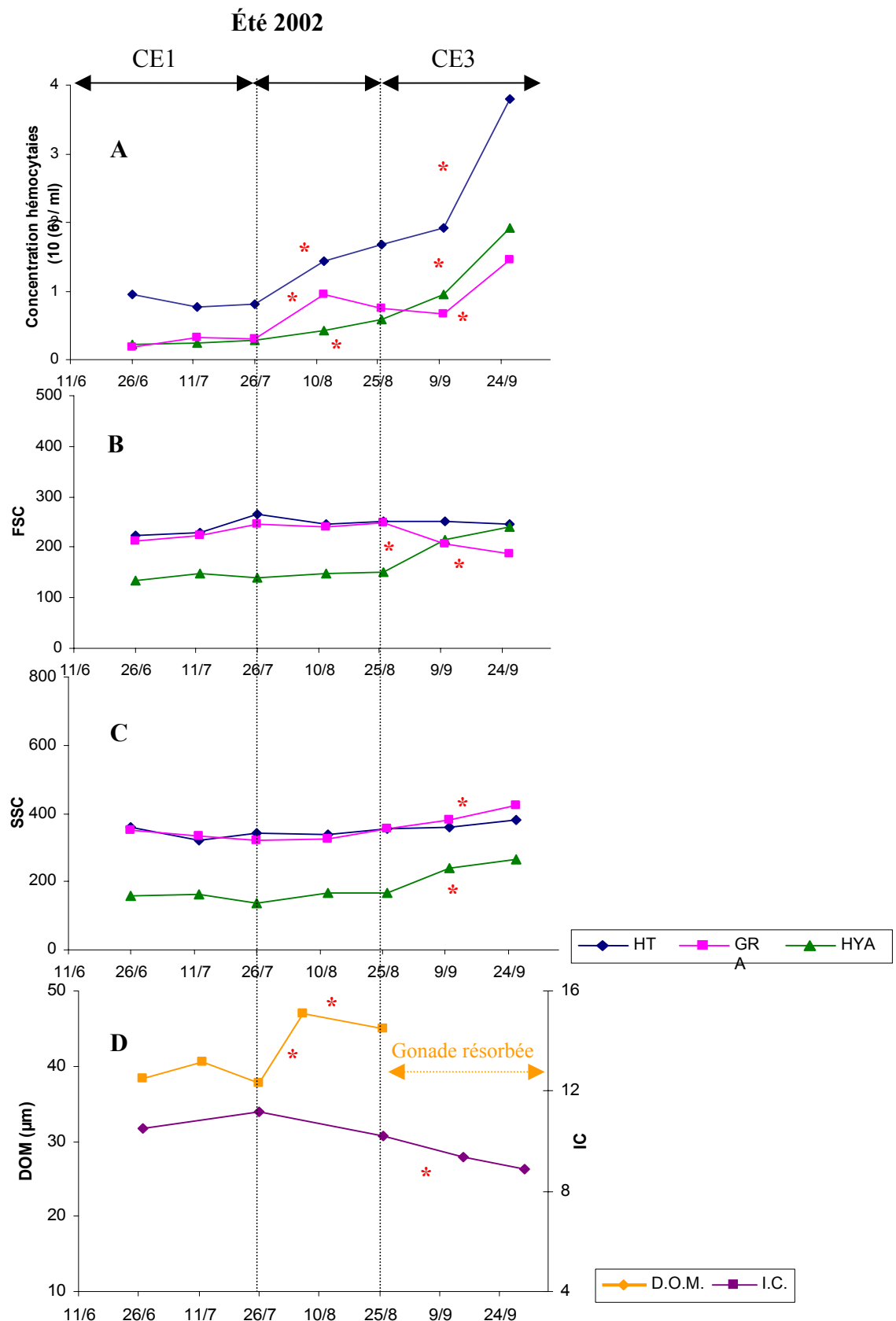


Figure 20 : Évolution des paramètres immunitaires et ceux de suivi du cycle sexuel chez *R. decussatus* en conditionnement d'été. A : Évolution de la concentration hématocytaire totale et différentielle. B : Évolution de la taille des hématocytes. C : Évolution de la complexité hématocytaire. D : Évolution du diamètre ovocytaire moyen et de l'indice de condition. * différence significative au seuil α (5%). CE1, CE2, CE3 : 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} phase du Conditionnement d'Été.

3.3.3.2. Paramètres biochimiques

La figure 21 présente la variation des taux des protéines sériques et l'évolution de l'activité de la phosphatase acide dans le sérum des palourdes conditionnées en été. Le taux des protéines sériques varie non significativement (K-W, $p>0.264$) pendant le conditionnement, tandis que l'activité de la phosphatase acide enregistre des variations significatives (M-W, $p=0.005$) pendant le 2^{ème} mois de conditionnement (26 juillet – 26 août) où elle marque un pic à la mi-août, puis chute pour rejoindre les valeurs identiques à celles observées au début de ce mois.

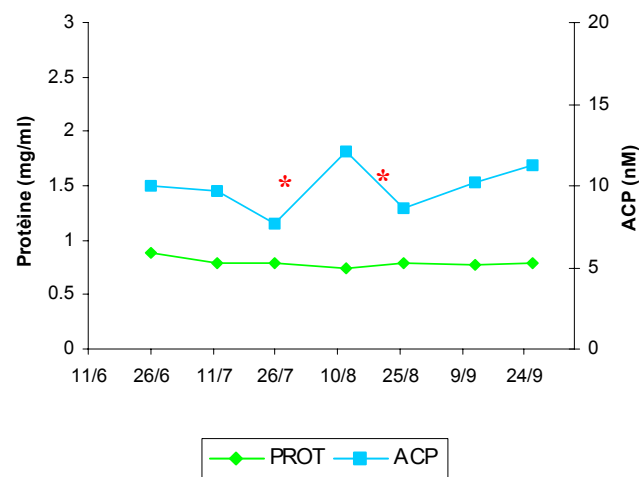


Figure 21 : Variation du taux des protéines sériques et évolution de l'activité de la phosphatase acide chez *R. decussatus* en conditionnement d'été * Différence significative au seuil α (5%)

3.3.3.3. Relation entre paramètres immunitaires et paramètres de suivi du cycle sexuel

Les variations des paramètres immunitaires et des estimateurs de la reproduction révèlent la présence de trois phases dans le cycle de conditionnement d'été. Ces phases ont été choisies en se basant sur les variations significatives des paramètres immunitaires :

Phase CE1 : du 26 juin au 26 juillet (1^{er} mois de conditionnement). Durant cette période le DOM et l'IC varient non significativement (Fig. 20D), de même pour la concentration, taille et structure des hémocytes (Fig. A/B/C/).

Phase CE2 : du 27 juillet au 26 août (2^{ème} mois de conditionnement) où le DOM et la CHT augmentent significativement (Fig. 20A/D). La taille et la structure des hémocytes ne varient pas (Fig. 20B/C).

Phase CE3 : du 27 août au 26 septembre (3^{ème} mois de conditionnement). Au cours de cette période une diminution significative de l'IC est observée, la gonade présente un aspect (Fig. 20D) Une augmentation brutale de la concentration en hémocytes est observée ($3,8 \cdot 10^6$ cel./ml) (Fig. 20A). La taille des HYA augmente également, par contre celle des GRA diminue (Fig. 20B) et la complexité des deux populations hémocytaires augmente (Fig.20C). Des corrélations négatives ($R^2 = 0,78$, $p=0,019$) sont observées entre concentration hémocytaire totale et indice de condition.

Les variations de l'activité de la phosphatase acide en été et précisément durant le 2^{ème} mois de conditionnement (le 26 juillet et 26 août) (Fig. 21) témoignent d'une relation entre les paramètres biochimiques et les estimateurs du cycle sexuel. En effet les variations de l'ACP montrent que l'augmentation enregistrée pendant la première quinzaine d'août coïncide parfaitement avec l'augmentation significative du diamètre ovocytaire pendant la même période (Fig. 20D, CE2). Par la suite, les trois paramètres (IC, DOM et ACP) diminuent parallèlement du 10 août au 26 août.

3.4. Discussion

Nos recherches ont permis de suivre les évolutions de composants du système immunitaire de *Ruditapes decussatus*, *in situ* et en conditionnement en réalisant deux types d'analyses :

une analyse cellulaire de l'hémolymphe à savoir le calcul de la concentration totale et différentielle des hémocytes et la mesure de leurs tailles et de leurs complexités ;

une analyse biochimique de l'hémolymphe par dosage des protéines sériques et mesure de l'activité de la phosphatase acide dans le sérum.

Les résultats de ces analyses ont été couplés avec ceux de l'étude du cycle sexuel chez les mêmes individus, afin de trouver un lien entre paramètres immunitaires et caractérisation de la maturation ovocytaire. Les estimateurs du cycle sexuel qui ont été étudiés, sont le diamètre ovocytaire moyen et l'indice de condition.

En milieu naturel, la concentration totale hémocytaire suit la même évolution saisonnière que la température. La concentration en hémocytes circulants est faible pendant l'automne et l'hiver ($2,8.10^6$ cel./ml $\pm 0,5$) et marque une nette augmentation pendant le printemps et l'été ($4,4.10^6$ cel./ml $\pm 0,4$). Cette élévation de la concentration est vraisemblablement liée à l'augmentation des granulocytes observée pendant la même période. Ces variations de la concentration hémocytaire seraient dues aux modifications de l'état physiologique elles-mêmes liées aux variations saisonnières. Des travaux similaires étudiant l'effet des facteurs environnementaux sur le système de défense des bivalves ont montré des résultats similaires : une augmentation significative de la concentration hémocytaire pendant la période printanière et estivale et des faibles valeurs pendant l'hiver et le printemps (Feng, 1965 ; Fisher, 1988 ; Fisher *et al.*, 1996 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Olivier & Fisher, 1999)

La synthèse des résultats de l'évolution des paramètres immunitaires et des estimateurs du cycle sexuel, obtenus en milieu naturel et en conditionnement permet de différencier 3 phases :

Une phase d'adaptation nommée **P1** correspondant à la phase CH1 pour le conditionnement hiver 2002 et CE1 pour le conditionnement d'été 2002. Cette phase est observée pendant le premier mois de conditionnement, pendant la quelle tous les paramètres aussi bien immunitaires que de reproduction varient non significativement. Les travaux de Oubella *et al.*, (1993) vont dans le même sens, ils ont montré une variation non significative de la concentration hémocytaire chez *R. decussatus* et *R. philipinarum* placées en conditionnement

et ceci pendant une durée de 7 jours. Paillard *et al.*, (1994) et Allam (1998) ont obtenus des résultats identiques chez *R. philipinarum*, après une durée maximum de 7 semaines, aucune variation significative de la concentration hémoducytaire n'est signalée.

Une phase de reproduction ou d'intense activité gonadique et hémoducytaire, nommée **P2** correspondant à la phase MN2 (milieu naturel), CH2 (conditionnement hiver 2002) et CE2 (conditionnement été 2002). Durant cette phase des augmentations significatives de la concentration hémoducytaire sont observées parallèlement avec ceux du DOM et de l'IC. Selon nos résultats, en milieu naturel, la mobilisation de plus en plus d'hémoducytes dans le compartiment circulatoire est surtout lié à l'élévation de la température qui varie entre 12 et 27°C dans le golfe de Gabès pendant la période d'échantillonnage (Fig. 4 chapitre I). Cette corrélation positive entre température et concentration hémoducytaire a été signalée par plusieurs études faites sur l'influence des facteurs environnementaux sur le système de défenses chez les mollusques bivalves (Feng, 1965 ; Fisher, 1988 ; Fisher *et al.*, 1989). Allam (1998) et Paillard *et al.* (2004) obtiennent des résultats similaires en milieu contrôlé et considèrent qu'il existe un effet modulateur de la température sur les paramètres de défenses de *R. philipinarum* ; une forte concentration hémoducytaire est observée chez des animaux maintenus à 21°C par comparaison aux lots incubés à 8°C et 14°C. De même, une augmentation du nombre d'hémoducytes circulants avec l'élévation de la température a été observée chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata* (Stumpf & Gilbertson, 1978), l'huître creuse *C. virginica* (Chu & La Peyre, 1993) et la moule *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998). Selon ces auteurs la mobilisation de plus en plus d'hémoducytes dans le compartiment circulatoire est due soit à l'augmentation du rythme cardiaque, soit à l'accroissement de l'activité métabolique provoquée par l'élévation de la température. En conditionnement, l'augmentation de l'activité hémoducytaire et gonadique peut être aussi associée à l'apport nutritif. Oubella *et al.*, (1993) et Oubella (1996) ont montré l'effet marquant de la nourriture sur la concentration en hémoducytes circulants chez *C. gigas*, *M. edulis*, *R. philipinarum* et *R. decussatus*. Selon ces auteurs, l'apport nutritif induit une augmentation progressive du nombre d'hémoducytes, toutefois cette augmentation est réversible après un jeun. Ceci signifie que la mobilisation des hémoducytes dans le compartiment circulatoire est liée à la présence de ressources nutritives dans le milieu. L'augmentation de la concentration hémoducytaire aurait pour origine la migration des hémoducytes des tissus vers le compartiment hémoducyphatique en relation avec leur rôle dans la digestion et le transfert des métabolites pour l'approvisionnement des gonades en période de reproduction (Feng *et al.*, 1977 ; Cheng, 1981).

Outre la température, des corrélations positives ont été mises en évidence dans ce travail entre la concentration hémocytaire et l'indice de condition pendant la période de reproduction, suggérant ainsi que le nombre d'hémocytes circulants augmente avec la masse tissulaire des individus. Cette hypothèse a été confirmée pour la palourde *R. philipinarum* (Auffret & Oubella, 1994 ; Oubella, 1996) mais infirmée pour l'huître *C. virginica* (Feng, 1965) et la moule *M. edulis* (Carballal *et al.*, 1998).

Une phase d'émission gamétique, nommée **P3** qui correspond à la phase MN3 (milieu naturel) et CE3 (conditionnement été 2003). En effet deux cas de figure se présentent durant cette phase :

des émissions gamétiques partielles (cf. chapitre 1, Discussion) (phase MN3, Fig. 16 A/D). Dans ces cas on observe des corrélations positives entre les paramètres immunitaires et ceux de la reproduction : la concentration hémocytaire diminue ainsi que l'indice de condition et le diamètre ovocytaire moyen ;

une résorption complète de la gonade (phase CE3, Fig. 18 A/D). Dans ce cas il s'agit de corrélation négative entre les deux paramètres : la concentration hémocytaire augmente alors que l'indice de condition diminue.

Ainsi, on peut attribuer aux hémocytes un second rôle autre que l'approvisionnement des gonades en période de reproduction, un rôle de nettoyage des gonades suite aux émissions gamétiques.

Peu de travaux ont été réalisés pour tenter d'établir une relation sur le comportement hémocytaire dans un cycle de reproduction. Olivier et Fisher (1995) ont montré que la différence dans le développement gonadique chez *C. virginica* affecte le nombre et la fonction des hémocytes lorsqu'il s'agit de transport de réserve ou de processus de résorption. Ishikawa *et al.* (1998) ont montré que l'activité phagocytaire des hémocytes chez *C. gigas* augmente parallèlement avec le développement gonadique, le maximum est observé en période de maturation. Après la ponte, l'activité phagocytaire chute rapidement et se rétablit avec la reprise de la gamétogenèse. Suresh et Mohandas (1990) considèrent qu'en période de résorption, il y avait mobilisation des hémocytes vers la gonade, d'où la baisse de la concentration en hémocytes circulants. Dans le cadre de cette étude le phénomène inverse est observé, c'est à dire une augmentation importante de la concentration hémocytaire en période de résorption. En revanche chez *M. edulis* aucune variation significative de la concentration hémocytaire n'a été observée pendant la période d'émissions gamétiques (Carballal *et al.*,

1998). Dorange (1989) montre l'existence de cellules macrophages dans les acini mâles et femelles de *Pecten maximus* en période d'émission gonadique et souligne leurs caractéristiques : ils sont riches en inclusions osmiophiles de type lysosomal et chargés d'éléments résiduels qui reflètent leur aptitude à la résorption. Ils phagocytent ainsi les gamètes résiduels d'apparence normale ou altérés. Après les pontes et plus généralement pendant la période hivernal (repos sexuel), ces hémocytes ont été observés dans la lumière des acini. De même, des travaux réalisés sur l'effet des contaminants sur le système de défense chez les bivalves ont montré que les granulocytes sont moins sensibles que les hyalinocytes aux contaminants du fait qu'ils sont capables d'isoler les éléments d'origine exogène, y compris les micro-polluants, grâce à leur système lysosomal. Moore et Lowe (1977) soulignent aussi le rôle primordial des granulocytes dans la défense interne chez *M. edulis* par leur activité macrophage. Ces diverses études expliquent alors l'augmentation de la complexité et la concentration des granulocytes observés dans cette étude pendant les périodes des émissions gamétiques (Fig. 16C (MN2) / 19C (CE3)), qui sont fortement liées avec leur rôle de phagocytose.

D'autres études ont montré que la maturation des gonades est associée à une augmentation de la prévalence des parasites, comme chez *Anodonta piscinalis* (Taskinen & Saarinen, 1999) par le biais de la filtration qui devient plus importante en période de reproduction. Cette exposition aux parasites engendre dans la quasi-totalité des cas une augmentation de l'activité hémocytaire qui joue un rôle de défense contre l'agent pathogène (Cheng & Rodrick, 1974 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Carballal *et al.*, 1998 ; Olivier & Fisher, 1999 ; Allam *et al.*, 2001 ; Paillard *et al.*, 2004). Cette hypothèse nous mène à poser des hypothèses quant à l'augmentation brutale de la concentration hémocytaire observée pendant le dernier mois de conditionnement d'été (P3). Pourrait-elle être causée par la présence de parasite tel que le genre *Perkinsus* ? Protozoaire induisant des fortes mortalités chez les palourdes (Montes *et al.*, 1995 ; Montes *et al.*, 1996 ; Ordàs & Figueras., 1998) et sa prévalence est maximale en été où la température de l'eau est supérieure à 20°C (Chu & Greene, 1989 ; Chu & La Peyre, 1993 ; Burreson *et al.*, 1994). Ce parasite hiberne dans l'animal lorsque les conditions du milieu sont défavorables (température faible < 20°C) et se multiplie rapidement dès que les conditions s'améliorent, entraînant progressivement la mort de son hôte. Dans le cas de notre étude, cette hypothèse peut être rejetée si on se base sur les travaux de Choi et Park (in press) qui montrent une corrélation négative entre l'intensité de l'infection par *Perkinsus* et l'effort de reproduction chez *R. philippinarum*. Les palourdes infectées par *Perkinsus* sont incapables

de produire un nombre important d'ovocytes pendant leur cycle de reproduction. Ceci a été confirmé chez les huîtres (Choi *et al.*, 1993, 1994) où *Perkinsus* interfère, ou retarde le processus de reproduction, en utilisant toute l'énergie allouée pour la formation ou la maturation des gamètes. Dans notre cas, la production ovocytaire est élevée selon les résultats histologiques acquis, aucune atresie n'a été observée en dehors des périodes d'émissions gamétiques (cf. chapitre 1, Résultats).

Chez les mollusques bivalves, l'hypersynthèse d'enzymes lysosomales et leur libération dans la fraction sérique de l'hémolymphe sont considérées comme étant un processus de défense à médiation humorale (Chu, 1988). La forte activité enzymatique dans les hémocytes est le résultat d'une hypersynthèse dans les phagocytes déclenchée par la présence d'agents pathogènes au sein de l'hôte (Cheng, 1975 et 1981). Feng et Canzonier (1970) ont montré une augmentation de l'activité du lysozyme dans l'hémolymphe de *C. virginica* infectée par *Bucephalus sp.* Oubella *et al.* (1994) et Allam *et al.* (2001) ont obtenus les mêmes résultats pour *R. philippinarum* infecté par *Vibrio tapetis*. En revanche, l'activité du lysozyme n'a pas été modifiée chez des huîtres infectées par *Haplosporidium nelsoni* et *Perkinsus marinus* (Feng & Canzonier, 1970 ; Chu & La Peyre, 1989). Lopez *et al.* (1997) montrent que les enzymes lysosomales sont présentes uniquement dans les cellules granuleuses, la phosphatase est ainsi détectée dans le cytoplasme des granulocytes du fait de leur important rôle dans la phagocytose. Dans le cas de cette étude, l'activité de la phosphatase acide dans le sérum varie non significativement pendant le conditionnement d'hiver tandis qu'elle enregistre des variations significatives au cours du conditionnement d'été : une augmentation de l'ACP en parallèle avec celle du DOM et une baisse de l'ACP pendant les émissions gamétiques sont alors observées, ceci suggère le rôle potentiel de la phosphatase acide dans la maturation ovocytaire. Les travaux de Dorange (1989) renforcent cette idée, cet auteur note qu'ils existe une très forte activité de la phosphatase acide dans les ovocytes d'apparence mature chez *Pecten maximus*. Ainsi les enzymes lysosomales semblent avoir un double rôle, un rôle de défense et un rôle de nutrition, comme l'a suggéré Chu (1988) dans ces travaux sur les défenses humérales chez les mollusques bivalves.

D'après Ford (1986), des faibles concentrations en protéines dans l'hémolymphe indique l'altération des conditions physiologiques par la présence d'agent pathogène, comme le cas de *C. virginica* infecté par *Haplosporidium nelsoni*. Oubella *et al.* (1994) et Allam (1998) montrent aussi des faibles valeurs en protéines sériques chez *R. philippinarum* infecté par *V.*

tapetis par rapport au témoin, sans signaler de différence significative entre les deux lots. Ces auteurs considèrent que les faibles concentrations de protéines dans le surnageant de l'hémolymphé témoignent des modifications métaboliques chez ces individus qui peuvent se traduire par une plus faible croissance coquillière (Goulletquer *et al.*, 1989 ; Paillard, 1992). D'après Chu et La Peyre (1993) une baisse des concentrations en protéines dans l'hémolymphé pourrait être le résultat d'une stratégie de défense favorisant la production de cellules hémostyaires au détriment des protéines circulantes. Dans le cas de cette étude, aucune variation significative n'a été enregistrée dans la concentration en protéines dans l'hémolymphé des palourdes conditionnées en hiver et en été ; suggérant ainsi que les conditions physiologiques étaient satisfaisantes et les palourdes étaient indemnes de tous agents pathogènes susceptibles d'entraîner des modifications métaboliques pouvant altérer leur état de santé.

3.5. Conclusion

Cette étude nous a permis d'évaluer l'état du système immunitaire des palourdes issues du milieu naturel et celles placées en conditionnement dans deux périodes de l'année (hiver et été) en réalisant des analyses cellulaires et biochimiques de l'hémolymph. Ces analyses ont montré que les modifications des paramètres cytométriques (la concentration en hémocytes circulants) et biochimique (activité enzymatique) de l'hémolymph sont fortement liées aux changements de paramètres d'environnement, eux-mêmes sous la dépendance de variations saisonnières telle que la température. Des faibles valeurs de la concentration hémocytaire sont enregistrées en automne - hiver et une nette augmentation est observée en printemps – été. Néanmoins des mécanismes physiologiques, en particulier la reproduction, peuvent entraîner des changements profonds dans les paramètres de défense. Ainsi, en période de reproduction, on assiste à une migration des hémocytes des tissus vers le compartiment circulatoire pour le transport de métabolites pour l'approvisionnement des gonades d'où l'augmentation de la concentration hémocytaire observée pendant cette période. Au cours des émissions gamétiques deux cas de figure se présentent : si les émissions sont partielles on assiste à une diminution de la concentration hémocytaire et si elles sont complètes, on assiste à une forte augmentation de la concentration hémocytaire ; ceci nous laisse supposer que les hémocytes jouent un second rôle de nettoyage de la gonade après les émissions gamétiques.

Lors de cette étude des corrélations positives sont observées entre les estimateurs du cycle sexuel (indice de condition et diamètre ovocytaire moyen) et les paramètres immunitaires (concentration hémocytaire) aussi bien en cycle naturel qu'en éclosion expérimentale. Un faible nombre d'hémocytes circulants chez les palourdes issues du milieu naturel ou conditionnées a pu en effet être associé à un faible indice de condition et un faible diamètre ovocytaire moyen et *vice versa*.

Contrairement aux paramètres cytométriques de l'hémolymph, les paramètres biochimiques ne varient pas fortement avec le cycle de reproduction. Le dosage des protéines sériques témoigne d'aucune modification significative tout au long de l'expérience, toute fois il permet de considérer que les conditions physiologiques sont satisfaisantes pour les palourdes. L'activité de la phosphatase acide enregistre des variations parallèlement avec la maturation ovocytaire et le début de la résorption de la gonade, ce qui nous a permis de lui attribuer deux rôles, l'un de nutrition et l'autre de défense ou « nettoyage ».

L'ensemble de ces résultats met en lumière l'existence d'une relation étroite entre le système immunitaire et le cycle sexuel des palourdes et nous permet de proposer de nouveaux critères d'évaluation de leur état de maturité. Ceux-ci peuvent être basés sur un diagnostic de leur statut immunitaire, autre que les approches couramment utilisées pour l'évaluation de la maturité : des approches qualitatives (analyse histologique) et semi-quantitative (un indice de condition, analyse d'image) dont les résultats sont obtenus après scarification de l'individu échantillonné.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude nous a permis tout d'abord de décrire et de comparer la gamétogenèse chez *R. decussatus*, en milieu naturel (sud tunisien) et en milieu contrôlé, de définir les critères d'évaluation de leur maturité et de mettre en évidence le rôle positif du conditionnement dans la réussite de la reproduction artificielle. Afin de répondre à ces objectifs, des approches qualitatives (analyse histologique) et semi-quantitatives (suivi d'un indice de condition et analyse d'images) sont utilisées. Les résultats obtenus montrent que le cycle sexuel est continu. En janvier et février, les individus débutent leur gamétogenèse. De mars à novembre – décembre, l'activité gonadique est importante. La période d'émissions gamétiques s'étale de juin à décembre avec un intervalle de temps irrégulier entre les émissions. En conditionnement d'hiver, les palourdes produisent des ovocytes matures à partir de mars et les émissions gamétiques commencent en avril. Le cycle est alors accéléré grâce à l'élévation de température et l'abondance de nourriture, les reproducteurs produisent alors des gamètes matures plutôt dans l'année, en avance de trois mois par rapport au milieu naturel. Quant au conditionnement d'été, l'évolution du cycle sexuel est la même qu'en milieu naturel et les périodes de maturation et d'émissions gamétiques coïncident parfaitement. Ainsi, cette étude nous a permis de fournir des résultats essentiels pour la maîtrise du conditionnement de la palourde *R. decussatus*, permettant aux écloreurs d'évaluer l'état de maturité des géniteurs, de concentrer leurs efforts sur le conditionnement uniquement à certaines périodes de l'année allant de février à mai, ce qui leur permet de gagner autant en temps qu'en coût de production. Par ailleurs, afin de maîtriser d'avantage l'élevage de la palourde et perfectionner les techniques de production en éclosion, nous avons tenté de trouver une technique alternative aux chocs thermiques qui nous permet d'obtenir plus facilement et plus rapidement des gamètes matures pour la conduite d'un élevage larvaire. La méthode proposée est celle de la dissection de la gonade (stripping). Cette étude étant la première à s'intéresser à la maturation ovocytaire pouvant être induite par la sérotonine chez cette espèce de bivalve en milieu contrôlé. Nous avons ainsi montré que l'ajout de 20 μM de sérotonine au milieu extérieur permet la reprise de la méiose des ovocytes strippés en environ 90 minutes à 20°C. Le maximum de réussite étant de 67%. Par ailleurs, nous avons aussi pu évaluer la compétence des ovocytes débloqués à la fécondation. En effet, plus les géniteurs entrent en maturation plus le pourcentage des ovocytes fécondables augmente. A partir d'un seuil estimé à 53%, les géniteurs placés en milieu contrôlé, répondent positivement aux chocs thermiques subis. Ceci

nous permet d'estimer ce pourcentage comme un critère d'évaluation de la compétence des ovocytes à la fécondation et ainsi de choisir le moment propice pour la réalisation d'un élevage larvaire.

En 3ème et dernière partie, nous avons recherché si des variations des paramètres immunitaires (cellulaires et biochimiques de l'hémolymph) pouvaient être associées à des changements physiologiques liés à la reproduction, ceci dans le but d'approfondir notre étude, de mieux comprendre le comportement hémocytaire pendant le cycle de reproduction et de chercher de nouveaux critères de maturation en moyennant de nouvelles approches autres que celles couramment utilisées (histologie et analyse d'image) dans la littérature. Ainsi les mécanismes physiologiques liés à la reproduction entraînent des changements profonds dans les paramètres de défense de *R. decussatus* en milieu naturel ou en milieu contrôlé. En période de reproduction, on assiste à une migration des hémocytes des tissus vers le compartiment circulatoire pour le transport de métabolites pour l'approvisionnement des gonades d'où l'augmentation de la concentration hémocytaire observée pendant cette période. En période d'émissions gamétiques, on assiste à une diminution de la concentration hémocytaire, liée à la mobilisation des hémocytes vers la gonade. Dans le cas de la résorption complète de la gonade, une forte augmentation de la concentration hémocytaire est signalée, ceci nous permet d'attribuer aux hémocytes un rôle potentiel de nettoyage après atrésie. Outre les paramètres cellulaires, les paramètres biochimiques de l'hémolymph peuvent aussi témoigner des changements cycliques liés à la reproduction, en particulier en période de maturation gamétique où une forte synthèse d'enzymes lysosomales dans le sérum est observée, liée à leur rôle dans le transport de réserve. Ainsi afin de préciser le rôle des hémocytes et approfondir les liens entre la reproduction et l'immunité chez les bivalves, des dosages plus précis des activités fonctionnelles des hémocytes sont préconisés ; d'une part des tests fonctionnels tels que l'évaluation de la phagocytose pourraient être inclus dans le protocole, en association avec les activités microbicides afin de mieux préciser le rôle des hémocytes dans la défense, d'autre part des activités biochimiques tel que des mesures de métabolites comme les lipides dans l'hémolymph afin d'évaluer l'activité hémocytaire dans la reproduction.

Références bibliographiques

A

Abdelmajid, H., Leclerc-David, C., Moreau, M., Guerrier, P., Ryazanov, A., 1993. Release from the metaphase I block in invertebrate oocytes: possible involvement of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase III. *International Journal of Developmental Biology*. 37 (2), 279-290.

Allam, B., 1998. Rôle des fluides extrapalléaux des bivalves dans la défense immunitaire. Cas de la maladie de l'anneau brun chez la palourde, *Ruditapes philippinarum*. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. Brest*. 204 p.

Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of Aquatic Organism*. 33: 123 – 128.

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 63 – 69.

Allam, B., Paillard, C., Howard, A., Le Pennec, M., 2000. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Diseases of Aquatic Organisms*. 41 (2): 105 – 113.

Allam, B., Ashton, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. Clams. *Development and comparative Immunology*. 25: 365 – 375.

Ali, A., Vaca, J.A., 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*. 182, 373-385.

Auffret, M., 1988. Bivalve Hemocyte Morphology. *American Fisheries Society Special Publication*. 18: 169 – 177.

Auffret, M., 1989. Comparative study of the hémocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Osrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Fisheries Research*. 8 (2): 367 – 373.

Auffret, M., Oubella, R., 1994. Cytometric Parameters of Bivalve Molluscs: Effect of Environmental Factors. *Modulators of Fish Immune Responses*. 1: 23 – 32.

Auffret, M., Oubella, R., 1995. Cytological and Cytometric Analysis of Bivalve Mollusc Hemocytes. *Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates. Techniques in Fish Immunology*-4.

Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte Aggregation in the Oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* Measurement and Experimental modulation by Xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 118A (3): 705- 712.

B

Beedham, G.E., 1965. Repair of the shell in species of *Anodonta*. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 145: 107 – 125.

Beninger, P.G., 1984. Seasonal variations of the major lipid classes in relation to the reproductive activity of two species of clams raised in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys, 1863) and *T. philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79 : 79-90.

Beninger, P.G., & Lucas, A., 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79: 19-37.

Breber, P., 1980. Annual gonadal cycle in the carpet-shell clam *Venerupis decussata* in Venice lagoon, Italy. *Proceedings of the National Shellfish Association*. 70: 31-35.

Burreson, E.M., Ragone Calvo, L.M., La Peyre, J.F., Counts, F., Paynter Jr, K.T., 1994. Acute osmoic tolerance of the cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*

(Apicomplexa: Perkinsida). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109 A (3) : 575 – 582 ;

Bustos, E., Olavarria, E., 2000. Manual: El cultivo de la almeja (*Venus antiqua*). Division de acuicultura. Instituto de Fomento Pesquero. Chile. 22p.

C

Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité spatiale des stades larvaires et post-larvaires d'une population de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. 218 pp.

Carballal, M.J., Villalba, A., Lopez, C., 1998. Seasonal Variation and Effects of Age, Food Availability, Size, Gonadal Development, and Parasitism on the Hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate pathology*. 72: 304 – 312.

Catapane, E.J., 1983. Comparative study of the control of lateral ciliary activity in marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 75C, 403-405.

Chàvez-Villalba, J.E., 2001. Conditionnement expérimental de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. 186 pp.

Chàvez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.C., & Le Pennec, M., 2002a. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas* : a new approach. *Aquaculture*. 210: 171-186.

Chàvez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.C., & Le Pennec, M., 2002b. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*. 214: 115-130.

Cheng, T.C., Thakur, A.S., Rifkin, E., 1969. Phagocytosis as an internal defense mechanism in the Mollusca: with an experimental study of the role of leucocytes in the removal of ink particles in *Littorina scabra* Linn. Symposium on Mollusca. *Marine Biology Association. India, Bangalore*: 547 – 566.

Cheng, T.C., Rodrich, G.E., 1974. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Biological Bulletin*. 147: 311 – 320.

Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Annual. N. Y. Academy. Science*. 266: 343 – 379.

Cheng, T.C., 1981. Bivalves. *Invertebrate Blood Cells*. 1: 231 – 300.

Cheng, T.C., 1992. Selective induction of release hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*. 59: 179 – 200.

Choi, K.S., Lewis, D.H., Powell, E.N., Ray, S.M., 1993. Quantitative measurement of the reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management*. 24: 299 – 322.

Choi, K.S., Powell, E.N., Lewis, D.H., Ray, S.M., 1994. Instantaneous Reproductive Effort in Female American Oyster, *Crassostrea virginica*, Measured by a New Immunoprecipitation Assay. *Biological Bulletin*. 186: 41 – 61.

Choi, K.S., Park, K.I. (*In Press*). Effects of *Perkinsus* parasitism on fecundity of the manila clam *Ruditapes philippinarum* with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Chu, F-L.E., 1988. Humoral Defense Factors in Marine Bivalves. *American Fisheries Society Special Publication*. 18: 178 – 188.

Chu, F.L.E., Greene, K.H., 1989. Effect of Temperature and salinity on in Vitro Culture of the Oyster Pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsiea). *Journal of invertebrate Pathology*. 53: 260 – 268.

Chu, F-L. E., La Peyre, J.F., 1989. Effect of environmental factor and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 54: 224 – 232.

Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica* : temperature effects. *Diseases of Aquatic Organisms*. 16: 223 – 234.

Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adam & Réve, 1850): Morphofunctional characterisation. *Fish and shellfish Immunology*. 10: 677 – 693.

Colas, P., Dubé, F., 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 9, 539-548.

Couper, J.M., Leise, E.M., 1996. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory. Woods-Hole*. 191 (2), 178-186.

Croll, R.P., TOO, C.K.L., Pani, A.K., Nason, J., 1995. Distribution of serotonin in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 28 (2), 125-135.

Cunha, E.M., Machado, J., 2001. Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Canadian Journal of Zoology*. 79 (1), 95-100.

D

Dorange, G., 1990. Rôle de la reproduction dans le déterminisme du recrutement chez *Pecten maximus* (L.) de la Baie de Saint-Brieuc. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. Brest*. 140 p.

Dunachie, J.F., 1963. The periostracum of *Mytilus edulis*. *Transactions of the Royal Society of Canada*. LXV15: 383 – 411.

Dupuy, J.L., Windsor, N.T., & Sutton, C.E., 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery. *Special Report. Applied Science Ocean Engineering. Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point. VA (USA)*.

Feng, S.Y., 1965. Heart rate leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biological Bulletin*. 128: 198 – 210.

Feng, S.Y., Canzonier, W.J., 1970. Humoral responses in the American oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Bucephalus sp.* And *Minchinia nelsoni*. *Disease Fish Shellfish*. 497 – 510.

Feng, S.Y., Feng, J.S., Yamasu, T., 1977. Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. *Comparative Pathobiology. Invertebrate Immune Responses*.3: 31 – 67.

Fisher, W.S., Newell, R.I.E., 1986. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*. 170: 122 – 134.

Feng, S.Y., 1988. Cellular Defense Mechanisms of Oysters and Mussels. *American Fisheries Society Special Publication*. 18: 153 – 168.

Fisher, W.S., 1988. Environmental Influence on Bivalve Hemocyte Function. *American Fisheries Society Special Publication*. 18: 225 – 237.

Fisher, W.S., Chintala, M.M., Moline, M.A., 1989. Annual variation of estuarine and oceanic oyster *Crassostrea virginica* Gmelin hemocyte capacity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 127: 105 – 120.

Fisher, W.S., winstead, J.T., Olivier, L.M., Edmiston, H.L., Bailey, G.O., 1996. Physiology variability of eastern oysters from Apalachicola bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*. 15 (3): 543 – 553.

Fisher, W.S., Olivier, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay Florida: association of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology*. 51: 115 – 138.

Fong, P.P., Kyozyuka, K., Abdelghani, H., Hardege, J.D., Ram, J.L., 1994. *In vivo* and *in vitro* induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *The Journal of Experimental Zoology*. 269 (5), 467-474.

Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biological Bulletin*. 194 (2), 143-149.

Fong, P.P., Huminski, P.T., D'-Urso, L.M., 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *The Journal of Experimental Zoology*. 280 (3), 260-264.

Fong, P.P., Philbert, C.M., Robert, B.J., 2003. Putative serotonin reuptake inhibitor-induced spawning and parturition in freshwater bivalves is inhibited by mammalian 5-HT₂ receptor antagonists. *The Journal of Experimental Zoology*. A. 298A, 67-72

Ford, S.E., 1986. Effect of repeated hemolymph sampling on growth, mortality, hemolymph protein and parasitism of oysters, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 85A (3) : 465 – 470.

G

Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. *Masson & Cie, Paris*. 113 pp.

Gallois, D., 1977. Sur la reproduction des palourdes, *Venerupis decussata* (Linné) et des clovisses, *Venerupis aurea* (Gmelin) de l'étang de Thau (Hérault). *Vie et Milieu*. 27, 2A: 233-254.

Gardier, A.M., Trillat, A.C., Malagié, I., David, D., Hascoet, M., Colombel, M.C., Jolliet, P., Jacquot, C., Hen, R., Bourin, M., 2001. Récepteur 5-HT_{1B} de la sérotonine et les effets antidépresseurs des inhibiteurs de recapture sélectifs de la sérotonine. *Life Science*. 324, 433-441.

Gérard, A., Salaun, M., Tritar, S., 1989. Critères de compétence des larves à la métamorphose chez *Pecten maximus*. *Haliotis*. 19, 373-380.

Goulletquer, P., Héral, M., Béchemin, C., Richard, P., 1989. Caractérisation des anomalies de calcification chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* : comparaison des compositions en acides aminés de différentes parties de la coquille analysées par HPLC. *Aquaculture*. 81 : 169 – 183.

Guerrier, P., Leclerc, D.C., Moreau, M., 1993. Evidence for the involvement of internal stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Developmental Biology*. 159 (2), 474-484.

H

Haneji, T., Koide, S.S., 1988. Protein phosphorylation during 5-hydroxytryptamine-induced maturation of *Spisula* oocytes. *Experimental Cell Research*. 177 (1), 227-231.

Honkoop, P.J.C., Luttikhuisen, P.C., Piersma, T., 1999. Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as a synergistic triggers. *Marine Ecology Progress Series*. 180, 297-300.

I

Ishikawa, H., Takahashi, K., Osada, M., Matsutani, T., Mori, K., 1998. Effects of reproductive cycle on seasonal variation of phagocytosing activity in the hémocytes of *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*. 22 (1): 132 – 133.

K

Krantic, S., Dubes, F., Guerrier, P., 1993. Evidence for a new subtype of serotonin receptor in oocytes for the surf clam *Spisula solidissima*. *General and Comparative Endocrinology*. 90 (1), 125-131.

Kyosuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N., Yamashita, M., 1997. Change in intracellular Ca^{2+} is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Developmental Biology*. 182(1), 33-41.

Lango-Reynoso, F., Chàvez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 190: 183-199.

Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y.M., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 74: 351-366.

Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*. 216 p.

Le Pennec, M., 1987. Genèse de la coquille larvaire et post larvaire chez divers bivalves marins. *Thèse d'état. Université de Bretagne Occidentale*. 229p.

Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia). *Fish and Shellfish Immunology*. 7: 595 – 608.

Loosanoff, V., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology*. 1 : 1-136.

Lorteau, C., Auffret, M., Le Bris, H., 1995. Le système d'immuno-défense des mollusques bivalves. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 171 (6/7) : 423 – 429.

Louro, A., De La Roche, J.P., Campos, M.J., Roman, G., 2003. Hatchery rearing of the black scallop, *Chlamys varia*. *Journal of Shellfish Research*. 22 (1), 95-99.

Lowry, O.H., Rosenbrough, A.L., Randall., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 : 265-275.

Lubet, P., 1976. Écophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamellibranches. *Haliotis*. 7 : 49-55.

Lubet, P.E., 1984. Biologie de la reproduction de mollusques bivalves d'importance commerciale en Méditerranée. *Haliotis*. 14 : 49-68.

Lubet, P.E., & Mathieu M. 1999. Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. *L'Année Biologique*. 38 : 27-50.

M

Madrones-Ladja, J.A., 1997. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758), in the laboratory. *Aquaculture-Amsterdam*. 157 (1-2), 135-144.

Mann, R., 1979a. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 38: 121-133.

Mann, R., 1979b. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 59: 95-110.

Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M., Dubé, F., 1998. Localisation et quantification de la sérotonine au cours de la gamétogenèse et du développement embryonnaire de la palourde. 66^{ème} Congrès de l'Acfas. Session : S-157 Reproduction.

Medhioub, M.N., 1983. La conchyliculture en Tunisie. Projet Tunis/92/002. *Direction Générale de la Pêche et de l'Aquaculture. PNUD/FAO*. 83pp.

Medhioub, M.N., Lyameam, Y., Medhioub, A. & El Abed, A. 2000. Développement gonadique de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu contrôlé. *Quatrièmes journées tunisiennes des sciences de la Mer- Mehdia 17-19 nov 2000*.

Montes, J.F., Durfort, M., Garcia-Valero, J., 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cellular and Tissue Research*. 279: 529 – 538.

Montes, J.F., Durfort, M., Garcia-Valero, J., 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. It synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Diseases of Aquatic Organisms*. 26: 149 –157.

Moore, M.N., Lowe, D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles. *Journal of Invertebrate Pathology*. 29: 18 – 30.

Moreau, M., Leclerc, C., 1999. Étude de la reprise de la méiose et de la fécondation dans l'ovocyte de *Crassostrea gigas*. Rôle des canaux Ca^{2+} . Mise au point d'un test de fécondabilité des ovocytes. *Rapport interne. Centre de biologie du développement, université Paul Sabatier, Toulouse*. 22p.

Morvan, C., Ansell, A.D., 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Marine Biology*. 97 : 355-364.

O

Olivier, L.M., Fisher, W.S., 1995. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Diseases of Aquatic Organisms*. 22: 217 – 225.

Olivier, L.M., Fisher, W.S., 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers*. 4 (6): 510 – 530.

Olivier, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., Long, E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology*. 55: 203 – 222.

O'Connor, W.A., Heasman, M.P., 1995. Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys* (*Mimachlamys asperima*). *Aquaculture*. 136 (1-2), 117-129.

Ordas, M.C., Figueras, A., 1998. *In Vitro* culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33: 129 – 136.

Osanai, K., 1985. *In vitro* induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. *Bulletin of Marine Biological Station, Tôhoku University*. 18(1), 1-9.

Osanai, K., Kuraishi, R., 1988. Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. *Bulletin of Marine Biological Station, Tôhoku University*. 18(2), 45-56.

Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffret, M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of aquatic organisms*. 15: 193 – 197.

Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Change in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*. 64 (1): 33-38.

Oubella, R., 1996. Immune responses in bivalve molluscs. Effects of environmental factors on the internal defense. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. Brest*. 214 p.

Oubella, R., Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resources*. 9 (2): 137 – 143.

P

Paillard, C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum*. *Doctorat d'Université. Université de Bretagne Occidentale, Brest*. 296p.

Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown Ring Disease in Clams. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 219 – 240.

Paillard, C., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 1996. Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. *Aquatic Living Resources*. 9: 145 – 158.

Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 59: 247 – 262.

Parache, A., 1982. La palourde. *La Pêche Maritime*. 1254 : 496-507.

Pinilla, L., Ranchal, A., Aguilar, R., Aguilar, E., 1994. Role of the serotonergic system in the control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats. *European Journal of Endocrinology*. 130 (6), 617-624.

R

Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyozuka, K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *The Journal of Experimental Zoology*. 265 (5), 587-598.

Rodriguez-Moscoso, E., Arnaiz, R., 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture*. 162 : 125-139.

Ruddel, C.L., 1971. The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 18: 260 – 268.

S

Salaum, M., Boucher, J., Le Pennec, M., 1991. Prodissoconch shell characteristics as indicators of larval growth and viability in *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research*. 10 (1), 37-46.

Sastry, A.N., 1968. The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiological Zoology*. 41: 44-53.

Schuetz, A.M., 1975. Induction of nuclear breakdown and meiosis in *Spisula solidissima* oocytes by calcium ionophore. *The Journal of Experimental Zoology*. 191, 433-440.

Shafee, M.S., Daouadi, M., 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusc: bivalve), from the atlantic coast of Morocco. *Aquaculture and Fisheries Management*. 22: 203-216.

Sparks, A.K., Morado, J.F., 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*. 18: 139 – 152.

Stricker, S. A., Smythe, T. L., 2000. Multiple triggers oocyte maturation in nemertean worms: the roles of calcium and serotonin. *The Journal of Experimental Zoology*. 287, 243-261.

Stumpf, J.F., Gilbertson, D.E., 1978. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factors affecting variability. *Journal of Invertebrate Pathology*. 32: 139 – 152.

Suresh, K., Mohandas, A., 1990. number and types of hemocytes in *Sunetta scripta* and *Villorita cyprinoids* var. *cochinensis* (Bivalvia), and leukocytosis subsequent to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*. 55: 312 – 318.

T

Taskinen, J., Saarinen, M., 1999. Increased parasite abundance associated with reproductive maturity of the clam *Anodonta piscinalis*. *The journal of Parasitology*. 85 (3): 588 –591.

Tebble, N., 1966. British bivalve seashells. A handbook for identification. *Trustees of the British Museum (Natural History)*. London: 212 p.

Toba, M., Miyama, Y., 1991. Gonadal development and spawning induction in artificially conditioned Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57: 1269-1275.

Trigui-El Menif, N., Le Pennec, M., Maamouri, F., 1995. La reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* (mollusque, bivalve) sur les côtes tunisiennes. *Vie Marine*. 5: 35-42.

U

Uhler, G.C., Huminski, P.T., Les, F.T., Fong, P.P., 2000. Cilia-driven rotational behaviour in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *The Journal of Experimental Zoology*. 286 (4), 414-421.

V

Vaca, A.A., Alfaro, J., 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture-Amsterdam*. 182 (3-4), 373-385.

Varaksin, A.A., Varaksina, G.S., Reunova, O.V., Latyshe, N.A., 1992. Effect of serotonin, some fatty acids and their metabolites on reinitiation of meiotic maturation in oocytes of bivalve *Spisula sachalinensis* (Schrenk). *Comparative Biochemistry and Physiology. C.* 101 (3), 627-630.

W

Wagge, L.E., 1955. Amoebocytes. *Internationale Revue of Cytology.* 4: 31 – 78.

X

Xie, Q., Burnell, G.M., 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (A. Adams & Reeve 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. *Journal of Shellfish Research.* 13: 467-472.

Y

Yi, J., Anctil, M., Dubè, F., 1998. L'implication de l'AMP cyclique dans la reprise de la méiose chez les ovocytes de palourde. 66^{ème} Congrès de l'Acfas. Session : S-157 *Reproduction.*

Z

Zamouri-Langar, N., 1991. Le cycle sexuel de *Tapes decussatus*, Linnaeus 1758 (Bivalve/Veneridae) dans le canal de Tunis. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologie de la mer, Salammbô, Tunis.* 18 : 5-22.

Zine, NE., Menioui, M., Zaouali, J., 1998. Etude préliminaire de l'embryologie, de la vie larvaire et juvénile de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu contrôlé. *Vie marine.* 8 : 19 – 24.

Annexes

Annexe 1 : Choix du fixateur

Préparation des fixateurs

Glutaraldehyde

Fixation a froid avec une solution de glutaraldehyde contenant

- 2 vol de glutaraldehyde diluee à 6%
- 1 volume tampon cacodylate 0.4 M pH=7.4
- 1 volume de nacl 7%

(solution finale a 1100 mosmoles)

Lavant: tampon cacodylate 0.4 M pH=7.4 + 1 vol Nacl à 4%

Formol 6%

6 ml de formol (40 ‰) dans 100 ml d'eau de mer stérile

Fixateur	Caractéristiques
Formol	C'est un fixateur de pénétration et de réaction rapide. Il réagit essentiellement avec les protéines et les acides aminés, un peu avec le glycogène. Il conserve assez bien les systèmes enzymatiques.
Glutaraldéhyde.	<p>Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde. Il crée des pontages artificiels entre les protéines et des groupements aminés libres par phénomène d'addition. C'est pourquoi il est partiellement déconseillé comme fixateur dans les études cytochimiques, immunocytochimiques ou autoradiographiques.</p> <p>C'est un fixateur de pénétration assez lente. Il réagit fortement avec les protéines globulaires ou fibrillaires aussi bien que nucléaires (histones), cytoplasmiques et extracellulaires (glycoprotéines), la chromatine et les acides nucléiques. Il réagit faiblement avec les sucres et les polysaccharides comme le glycogène. Il ne réagit pas du tout avec les lipides et, en particulier, les phospholipides des membranes qui conservent donc leurs propriétés de semi-perméabilité.</p>

Choix du fixateur

Afin de conserver les échantillons à long terme, deux fixateurs ont fait l'objet de notre étude, le glutaraldehyde et le formol sous deux types de conservation, réfrigéré (48h) et congelé (48h)

Le premier travail consiste à trouver le fixateur qui conserve le mieux les échantillons à l'état frais (Tab. 1), puis le tester sous forme congelée et réfrigérée (Tab.2). Le type de conservation choisi est celui qui présente les résultats qui se rapprochent le plus de ceux trouvés à l'état frais

Le tableau 1 présente les résultats des concentrations hémodiaire totale (CHT) et différentielle (CHD) en hémodocytes à l'état frais : sans fixateur, fixé avec du formol et fixé avec du glutaraldehyde. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de différences significatives (K-W, $p > 0.05$) au niveau des CHT et CHD par les différents types de conservation.

Le tableau 2 présente les résultats des CHT, CHD des populations hémodiaires fixées avec du formol et conservées sous forme congelé (-80°C) et réfrigéré (6°C). La différence significative (M-W, $p = 0.010$) est observée seulement dans la CHT après réfrigération.

CC ((10^6) / ml)		Hémodocytes frais sans fixateur	Hémodocytes frais + formol	Hémodocytes frais + glutaraldehyde
CHT		4	2,68	2,97
CHD	GRA	2,3	1,17	1,10
	HYA	0,74	0,74	1,01

Tableau 1 : Concentration hémodiaire des échantillons d'hémodolymphe frais, fixé avec du formol et fixé avec du glutaraldehyde.

CC ((10^6) / ml)		Hémodocytes formolés instantané	Hémodocytes formolé + congelé (24h)	Hémodocytes formolé + réfrigéré (24h)
CHT		2,68	2,08	1,29
CHD	GRA	1,75	0,85	0,41
	HYA	0,76	0,67	0,42

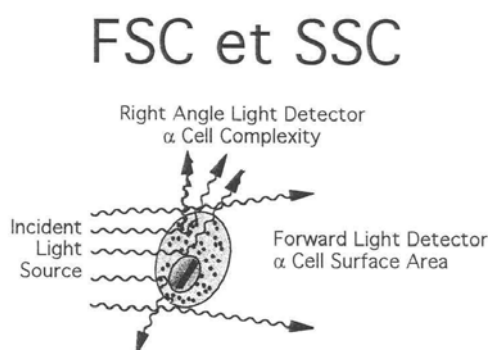
Tableau 2 : Concentration hémocytaire des échantillons d'hémolymphe fixé avec du formol sous forme congelée et réfrigérée. Seules les valeurs en rouge montrent des différences statistiquement avec celles de l'échantillon formolé instantanément.

Conclusion : Le fixateur qui a été utilisé par la suite est le formol sous forme congelé.

Annexe 2 : Rappels sur la technique de cytométrie en flux :

Le cytomètre utilisé au cours de cette étude est un cytomètre de type FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

La cytométrie en flux est une technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules isolées. Les mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques sont effectuées isolément sur chacune d'entre elles lorsque, entraînée par un fluide au centre d'une veine liquide, elle traverse la source d'excitation lumineuse (**faisceau laser**). Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe (angle < 12°), est proportionnelle à la taille de la cellule (**FSC : forward scatter**); celle diffractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (**SSC : side scatter**).



FACS
Academy

Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytomètre. L'affichage simultané des paramètres, FSC et SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur écran sous forme de point. C'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes qui apparaît. Selon les deux paramètres, il est possible de distinguer différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant d'une part les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC) et d'autre part les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène. Seules les valeurs concernant cette région sont analysées par l'emploi du logiciel. D'autres paires de signaux comme **FSC** et **Fluorescence** peuvent être considérées, de nouveaux points apparaissent représentant chacun une cellule en fonction de sa taille et de la fluorescence qui lui est associée. La relation entre la population de la zone d'intérêt et la fluorescence nécessite une autre présentation des données. Elles sont représentées par des histogrammes de distribution de fréquence : l'axe horizontal correspond à l'étendue des canaux, l'axe vertical au nombre de cellules par canal. Le nombre de canaux est de 0 à 1023 en échelle linéaire, de 0 à 104 en mode logarithmique utilisé souvent pour les mesures d'Intensité

de fluorescence dont les valeurs peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur. L'histogramme monoparamétrique de la fluorescence montre la distribution des cellules marquées. Les fluorescences détectées en FL 1 sont des fluorescences émises dans le vert, en FL 2 ce sont des fluorescences émises dans l'orange tandis qu'en FL 3, ce sont des fluorescences rouges.

Annexe 3 : Dosage des protéines sériques

informations: microméthode BIO-RAD

réactifs

- réactif A Bio-Rad
- réactif B Bio-Rad
- solution standard de protéines 2 mg / ml (Sigma)
- tampon TRIS salé (TBS)

solution de travail :

IMPORTANT: éviter toute bulle d'air

gamme étalon: préparer un gradient de protéines standards dans des microtubes

C finale (mg / ml)	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4
µl protéines standard		200			
µl solution précédente			100	100	50
µl tampon TBS filtré 0.2 µM		50	33	50	50

NB: une gamme doit être préparée pour chaque série de tests

Échantillons sans détergent

- pipeter 5 µl (en réplicats) de la gamme et des échantillons dans une microplaque

blanc: milieu d'incubation des cellules

- ajouter 25 µl de réactif A dans chaque puits
- agiter 1 min (speed = 10)
- ajouter 200 µl de réactif B dans chaque puits
- agiter 1 min (speed = 8)
- attendre 15 mn
- lire à 650-750 nm (MULTISKAN = 620 nm, GENESIS: protocole PRT_MA))

NB: absorbance stable pendant 1 h

échantillons avec détergent

- préparer une solution de travail A': 20 µl de réactif S / ml de réactif A à utiliser (stable pendant 1 semaine)

utilisation :

vérifier compatibilité avec réactifs: voir doc Bio-Rad

REFERENCES : Labo Lemar U.M.R. 6539 (immunité des mollusques)

Annexe 4 : Mesure de l'activité de la phosphatase acide

Test A.c.P (sérum)

informations

but: mesure de l'activité de la phosphatase acide extracellulaire

échantillons: sérum, milieu d'incubation de cellules

principe: hydrolyse d'un ester de phosphate inorganique (n-nitro phényl phosphate) en milieu acide

applications: évaluation du relargage par les hémocytes, mesure de l'intégrité des lysosomes (test de cytotoxicité)

NB: la [C] en protéines ne doit pas être inférieure à 0.1 mg/mL

Réactifs :

- p-nitro phényl phosphate (**NPP**) 6 H₂O (M = 263)
- p nitro phénol standard (10 µM/mL)
- tampon acétate 0.2 M pH 4.6
- tampon TBS
- NaOH 1M
- kit de dosage des protéines (Bio-Rad DC)

Solutions de travail :

réactif NPP à 8 mMol/L soit 2.1 mg/mL (prévoir 100 µl par échantillon en réplikat)

- NPP (C finale 4.4 mMol/L) 21 mg
- tampon acétate 10 mL

solution mère p-nitrophénol à 1µM/mL:

- p-nitrophénol standard 40 μ L
- TBS 360 μ L

gamme étalon

nM p-nitrophénol / puits	45	22.5	9	4.5
p-nitrophénol solution mère 1 μ M/mL (μ L)	45	22	9	4.5
TBS (μ L)	0	23	36	40.5
tampon acétate(μ L)	45	45	45	45

utilisation :

- pour chaque échantillon, distribuer 40 μ L par puits en réplicats
- ajouter 50 μ L de réactif par puits
- inclure un blanc (eau distillée + réactif) en réplicats
- agiter
- incuber la plaque à l'obscurité et à RT pendant 60 mn
- stopper la réaction en ajoutant 100 μ L par puits de NaOH 1N
- agiter
- lire immédiatement la DO à 405 nm (protocole *GENESIS*: ACP.PRT)
- exprimer les résultats en activité spécifique:

nM p-nitrophénol / mg protéines dans l'échantillon / mn d'incubation

REFERENCES : Labo Lemar U.M.R. 6539 (immunité des mollusques)